

GENSTRUKTUR UND EXPRESSION DES HNRNA-BINDENDEN PROTEINS A1

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Stephan te Heesen
aus Wuppertal

Bochum, April 1989

GENSTRUKTUR UND
EXPRESSION
DES HUNA-BINDENDEN
PROTEINS A1



Digitized by the Internet Archive
in 2026



GENSTRUKTUR UND EXPRESSION DES HNRNA-BINDENDEN PROTEINS A1

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Stephan te Heesen
aus Wuppertal
Bochum, April 1989

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
3.	ERGEBNISSE	7
3.1	Analyse von A1-spezifischen mRNAs	7
3.1.1	Isolierung von cDNAs	7
3.1.2	Restriktionskartierung	7
3.1.3	Sequenzanalyse	9
3.1.3.1	A1 α -cDNA	14
3.1.3.2	A1 α (0,7)-cDNA	14
3.1.3.3	A1 β -cDNA	14
3.1.3.4	A1(ins)	17
3.1.4	Expression von A1- und A1-Ähnlichen mRNAs	18
3.1.5	Bestimmung des Startpunkts von A1 mRNAs	20
3.2	Die Genstruktur des hnRNP-Proteins A1	22
3.2.1	Genomische Organisation von A1-Sequenzen	22
3.2.2	Isolierung genomischer A1-Klone	22
3.2.3	Sequenzanalyse von A1/15	24
3.2.4	Transkriptionale Aktivität von A1/15	30
3.2.5	Genomische Organisation von A1/15-Sequenzen	31
3.2.6	Promotoranalyse des 5'-Bereichs von A1/15	32
3.2.6.1	Studie eukaryotischer Promotorsequenzen	32
3.2.6.2	pBC12/Seap als Reporter-Vektor	35
3.2.6.3	Klonierung in pBC12/Seap	36
3.2.6.4	Analyse transkriptionaler Aktivität	36
3.3	DNA-Analyse mit Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)	39
3.3.1	Analyse der genomischen A1 α -Klone	40
3.3.2	Analyse der A1-Genstruktur in genomischer DNA	41
3.3.3	Sequenzierung von PCR-Produkten	48
3.3.4	Analyse der A2-Genstruktur	49
3.4	Experimente mit antisense-A1-Oligonukleotiden	50
4.	DISKUSSION	52
5.	MATERIALIEN	65
5.1	Bakterienstämme	65
5.2	Zelllinien	65
5.3	Vektoren/Klone	65
5.4	Enzyme	65
5.5	Reagenzien	65
5.6	Radiochemikalien	66

6.	METHODEN	67
6.1	Bakterien	67
6.1.1	Kultivierung	67
6.1.2	Transformation	67
6.1.2.1	Kalziumchlorid-Verfahren	67
6.1.2.2	Hanahan-Verfahren	67
6.1.2.3	M13-Transformation	68
6.2	DNA	68
6.2.1	Isolation von DNA	68
6.2.1.1	Phenolextraktion/Ethanol-fällung von DNA	68
6.2.1.2	Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA	69
6.2.1.3	Großpräparation von Plasmid-DNA	69
6.2.1.4	Präparation von kleinen Mengen λ -DNA	69
6.2.1.5	Großpräparation von λ -DNA	70
6.2.1.6	Präparation von λ CI ^{ts} Sam7 DNA	70
6.2.1.7	Präparation von M13-DNA	71
6.2.1.8	Elution von DNA aus Agarosegelen	71
6.2.1.8.1	Extraktion aus niedrig-schmelzenden Gelen	71
6.2.1.8.2	Elektroelution	71
6.2.1.8.3	Konzentrationsbestimmung	72
6.2.2	Analyse und Manipulation von DNA	72
6.2.2.1	Agarosegelelektrophorese	72
6.2.2.2	Restriktionen	72
6.2.2.3	Ligationen ²	72
6.2.2.4	Sequenzierung	73
6.2.2.4.1	M13-DNA	73
6.2.2.4.2	Doppelstrang-DNA	73
6.2.2.4.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	73
6.2.2.4.4	Computerauswertung	74
6.2.3	Synthetische Oligonukleotide	74
6.2.3.1	Synthese	74
6.2.3.2	Deprotektion und Abspaltung von der Säule	74
6.2.3.3	Präparative Gelelektrophorese	74
6.2.3.4	Analyse von Oligonukleotiden	75
6.2.4	Präparation von ³² P-markierter DNA	75
6.2.4.1	Markierung von Oligonukleotiden	75
6.2.4.2	Markierung von DNA-Fragmenten	75
6.2.5	Southern-Analyse von DNA	76
6.2.5.1	Diffusionstransfer	76
6.2.5.2	Vakuumtransfer	76
6.2.5.3	Hybridisierung mit Oligonukleotiden in situ	77
6.2.5.4	Hybridisierung mit Fragmenten	77
6.2.6	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	77
6.2.7	Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten	78
6.3	RNA	78
6.3.1	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	78
6.3.1.1	Gesamt-Cytoplasma-RNA	78
6.3.1.2	Poly(A) ⁺ -RNA	79

6.3.2	Gelelektrophorese von RNA	79
6.3.2.1	Methylquecksilber-Agarosegele	79
6.3.2.2	Formamidgele	79
6.3.3	Northern-Analyse von RNA	80
6.3.4	Primer-Extensions Analyse	80
6.4	Zellkultur	80
6.4.1	HeLa-Zellen	80
6.4.2	COS-Zellen	81
6.4.3	Transfektion von eukaryotischen Zellen	81
6.4.4	Nachweis sekretierter Alkalischer Phosphatase	81
6.4.5	Experimente mit anti-sense Oligonukleotiden	82
7.	LITERATUR	83
8.	CURRICULUM VITAE	89
9.	PUBLIKATIONSLISTE	91
10.	ANHANG	

Für Kerstin,

Jan und

Mathias

Herrn Prof. Dr. Klaus P. Schäfer möchte ich herzlich danken für die Überlassung des Themas, für die persönliche Betreuung sowie für das Bekanntmachen mit zahlreichen Wissenschaftlern auf dem Gebiet des RNA-Prozessierens.

Ich danke allen Mitglieder des Lehrstuhls für Biochemie, die mir in dieser Arbeit behilflich waren. Insbesondere möchte ich Herrn P. Cichocki danken für die Hilfe bei dem MACROPHOR-Gelsystem.

Mein Dank gilt der Fa. Byk Gulden (Konstanz) für das großzügige Bereitstellen eines Laborplatzes und der Arbeitsmaterialien. Allen Mitgliedern der Abteilung FB3 der Fa. Byk Gulden möchte ich danken für das gute Arbeitsklima. Hervorheben möchte ich Herrn Dr. H. Eistetter (Byk Gulden), der mich in die Technik der Transfektion von Säugerzellen eingeführt hat und Herrn Dr. T. Voß (Byk Gulden) für die Unterstützung bei dem VAX-Computersystem und das Zurverfügungstellen seines Literaturprogramms. Herrn Dr. K. Melchers (Byk Gulden) danke ich für die Überlassung der genomischen A1-Klone. Frau K. Hess und Frau S. Löffler (Byk Gulden) gebührt Dank für die Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten. Frau I. Hartig-Beecken möchte ich danken für die Synthese zahlreicher Oligonukleotide und die immerwährende Bereitschaft zu fruchtbaren Diskussionen. Herrn Dr. T. Voß, Herrn Dr. K. Melchers, Frau I. Hartig-Beecken, Herrn A. Keller (Byk Gulden) und meiner Frau Kerstin gilt mein Dank für die kritische Durchsicht von Teilen oder des ganzen Manuskripts und zahlreichen Anregungen.

Diese Arbeit wurde unterstützt mit einem Stipendium der Boehringer Ingelheim Stiftung für medizinische Grundlagenforschung. Ich möchte Herrn Dr. H. Schröder, Frau Dr. U. Mrwa, Herrn D. Schütz und ganz besonders Frau M. Beutelspacher vom Boehringer Ingelheim Fond danken für die persönliche, unbürokratische Betreuung während des Stipendiums.

Ich möchte besonders hervorheben, daß das Arbeitspensum dieser Dissertation ohne die permanente und bereitwillige Unterstützung durch meine Familie schwer zu bewältigen gewesen wäre.

ABKÜRZUNGEN

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
AA	Aminosäuren
aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ccc	kovalent geschlossener Plasmid-DNA-Ring ("supercoil")
Ci	Curie (= 37 MBq, Megabequerel)
cDNA	Copy-DNA
cpm	Zählimpulse pro Minute
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Thymidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	DL-Dithiothreitol
E. Coli	Eschericia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde
hnRNA	Heterogene nukleäre RNA (pre-mRNA)
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleo(protein)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure
ips	Impulse pro Minute (mit Handmonitor gemessen)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
MES	2-N-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Zimmertemperatur
S	Sedimentationseinheit (Svedberg-Einheit)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
ssDNA	Einzelsträngige DNA
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumenanteil pro Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil pro Volumenanteil
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

Die Struktur und die Expression der Multigenfamilie des hnRNA-bindenden Proteins A1 wurden in dieser Arbeit studiert. Die Analyse von cDNA-Klonen beweist die Expression von wenigstens zwei verschiedenen A1-Genen in menschlichen Zellen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beider cDNAs ist identisch. Der Vergleich der humanen A1-Sequenz mit der aus anderen Spezies zeigt eine außerordentliche Konservierung des Proteins A1 während der Evolution, vergleichbar den Histonen H3 und H4.

Die Sequenzanalyse einer weiteren cDNA, als A1(ins) bezeichnet, ergab eine Insertion von 156 bp in die A1-kodierende Region, ohne daß das Leseraster oder die Domänenstruktur des Proteins A1 unterbrochen wird. Die Expression der korrespondierenden mRNA konnte in HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

Der genomische Klon A1/15 wurde sequenziert und ergab ein Retro-pseudogen. Das Leseraster war intakt und kodierte für ein dem A1 sehr ähnliches Protein. Die Northernanalyse zeigte, daß mRNAs mit A1/15-Sequenzen in HeLa-Zellen exprimiert werden. Weiterhin fanden sich in 5'-Richtung vom mRNA-Startpunkt Sequenzen, die den Promotoren aktiver Säugergene ähnlich sind. Um diese Aussage zu stützen, wurden die Promotor- und mRNA-Start-Sequenzen von 94 zumeist humanen Genen aus der EMBL-Datenbank kompiliert und ein Konsensus abgeleitet. Die Untersuchung des 5'-Bereichs von A1/15 auf Promotoraktivität führte aber zu keinem Hinweis auf Transkription des Pseudogens.

Die Struktur humaner A1-Gene wurde mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht. Die Analyse ergab neben den erwarteten Pseudogensignalen auch Banden höheren Molekulargewichts, die intervenierende Sequenzen von 100-500 bp im kodierenden Bereich von A1 anzeigen könnten.

Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) wird im Zellkern als längeres Vorläufermolekül (hnRNA oder primäres Transkript) synthetisiert. Bevor die genetische Information in Form von mRNA in das Cytoplasma gelangt, wird die hnRNA umfangreich prozessiert (1-3).

Prozessierung von hnRNA

Die ersten Schritte des Prozessierens finden bereits statt, wenn die Transkription noch nicht beendet ist (Abb. 1). An das 5'-Ende der hnRNA wird ein modifiziertes Guanodin, ein sogenanntes "Cap" angehängt, und die ersten Nukleotide werden methyliert (4). Es findet eine Komplexierung der RNA mit hnRNA-bindenden Proteinen (hnRNP-Proteinen) statt (5-7). Diese Proteine übernehmen nach allgemeiner Ansicht Aufgaben der Stabilisierung, Verpackung und Etablierung einer speziellen räumlichen Konfiguration der hnRNA. Die letztere Eigenschaft ist besonders wichtig für den Prozeß des Spleißens der hnRNA (8,9). Hierbei müssen intervenierende Sequenzen entfernt und die verbleibenden Exonsequenzen wieder verknüpft werden. Dieser Schritt muß auf ein Nukleotid genau durchgeführt werden, um ein eventuelles Protein-Leseraster nicht zu unterbrechen. Weiterhin müssen Prozesse wie alternatives Spleißen (10) in höheren Zellen präzise durchgeführt werden.

Das korrekte 3'-Ende der mRNA wird durch einen endonukleolytischen Schnitt generiert und in den meisten Fällen durch eine Poly(A)-Polymerase um etwa 200 Adenosine verlängert (11). Das Poly(A)-Ende scheint eine Rolle bei der Stabilisierung von mRNAs zu spielen (5). Schließlich wird die reife mRNA durch die Kernporen in das Cytoplasma transportiert, wo sie zur Translation zur Verfügung stehen kann (12). Nur vollständig prozessierte mRNA scheint in das Cytoplasma zu gelangen (2).

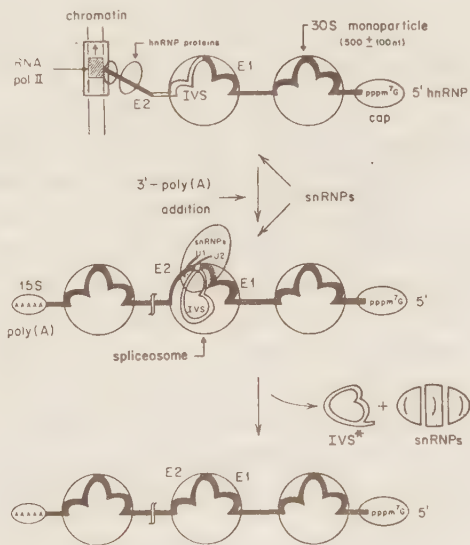
hnRNP-Komplexe

hnRNP-Proteine binden an die hnRNA bereits in statu nascendi, während die Nukleinsäure noch am Chromatin anhaftet (13,14) (Abb. 1). Der entstehende hnRNP-Komplex erscheint elektronenoptisch der Nukleosomenanordnung des Chromatins ähnlich: Wie Perlen auf einer Kette erscheinen einzelne partikuläre hnRNP-Subkomplexe von jeweils 20-30 nm Durchmesser auf der hnRNA aufgereiht, ununterscheidbar dem elektronenmikroskopischen Bild von aktivem Drosophila-Chromatin (16-19).

Durch die Extraktion von Zellkernen bei leicht erhöhtem pH lassen sich größere hnRNP-Komplexe in ihre kleinen, relativ homogenen, bei etwa 30 S sedimentierenden partikulären Untereinheiten spalten. Die 30 S Partikel sind biochemischen Untersuchungen gut zugänglich (15,20-25).

Monomere hnRNP-Partikel aus HeLa-Zellen enthalten mehr als 80 % an Proteinen, den Rest (500-700 Nukleotide) stellt die hnRNA (7,21,25).

Abb. 1: Schema des hnRNA-Prozessierens. E1: Exon 1; IVS: Intron; E2: Exon 2; pppm⁷G: mRNA-"Cap" (4). Bereits während der Transkription binden hnRNP-Proteine an die hnRNA. Ein endonukleolytischer Schnitt generiert das 3'-Ende der mRNA. Hieran werden etwa 200 Adenosine ansynthetisiert (11) und es erfolgt Bindung des Poly(A)-bindenden-Proteins (26,27). In dieser Darstellung wird unter Beteiligung von snRNPs (engl. small nuclear ribonucleoprotein particles) ein kleines Intron, das auf einem "Spliceosome" oder Spleiß-komplex untergebracht werden kann, aus der hnRNA entfernt. Das freie Intron ist als Lasso-Struktur ("lariat") nachweisbar (IVS*). Genauere Angaben hierzu finden sich bei Green (8) und Padgett et al. (9). Die genaue zeitliche Abfolge der Schritte ist nicht immer klar. (Aus: Dreyfuss, (7)).



Eine Gruppe von zumeist basischen Proteinen konnte charakterisiert werden durch ihre Eigenschaft, die 30 S hnRNP-Partikel zu rekonstituieren (24-25). Die Proteine A1 (32 kDa), A2 (34 kDa), B1 (36 kDa), B2 (37 kDa), C1 (31 kDa) und C2 (44 kDa) stellen etwa 98 % des Anteils an Proteinen im hnRNP-Komplex. Sie werden in Analogie zu den Histonen als Core-Proteine bezeichnet. Mit den Mitteln zweidimensionaler Gelelektrophorese (28) lassen sich noch andere Proteine nachweisen, so daß mindestens etwa 10 Proteine an der hnRNP-Struktur beteiligt sind (23-25,29,30). Viele der Proteine sind untereinander stark verwandt und besitzen zum Beispiel ähnliche Aminosäurezusammensetzungen und isoelektrische Punkte (24). Antikörper gegen hnRNP-Proteine binden an korrespondierende Proteine aus dem gesamten Eukaryotenreich (31-34) und ein dem A1 entsprechender cDNA-Klon aus dem niederen Schleimpilz Physarum polycephalum kreuzhybridisiert mit humaner DNA (35). Dies weist auf eine bemerkenswerte Konservierung von hnRNP-Proteinen hin.

Für die C-Proteine spezifische monoklonale Antikörper inhibieren in vitro Spleißreaktionen, ebenso die Immunodepletion der C-Proteine aus Spleißextrakten (36). Das gleiche Ergebnis wird mit polyklonalen Antikörpern erhalten, welche die A-Proteine erkennen (37). Diese Resultate weisen auf eine unentbehrliche Funktion der hnRNP-Proteine während des Prozessierens hin.

HnRNP-Proteine A1 und A2

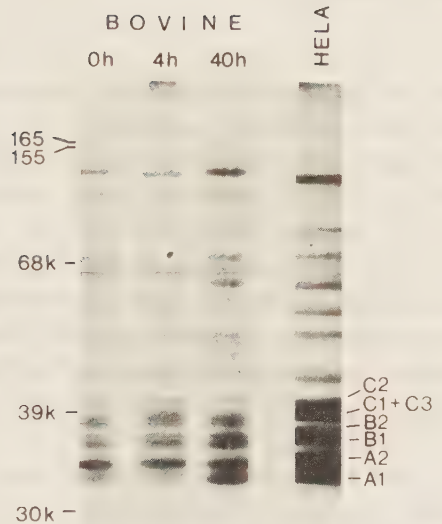
Die Proteine A1 und A2 machen allein etwa 60 % der Proteinmasse im hnRNP-Partikel aus (21) und gehören zu den häufigsten Proteinen im Zellkern. Auffällig ist ihr hoher Gehalt an Glycin (25 %), die stark basischen isoelektrischen Punkte (pI etwa 9,3 bzw. 9,4), blockierte Aminotermi und das Vorkommen eines ungewöhnlichen N^ε, N^ε-Dimethylarginins. Das A1 besteht aus 319 Aminosäuren, die sich grob in zwei Domänen gliedern lassen (38). Die 195 N-terminalen Aminosäuren des A1 entsprechen dem ssDNA-bindenden Protein UP1 (39) und werden durch proteolytische Spaltung von A1 freigesetzt (40). Das UP1-Fragment besteht aus zwei vermutlich globulären Unterdomänen, von denen jede eine RNP-Konsensussequenz aufweist (38,41,42). Der C-Terminus (124 Aminosäuren) besteht zu 40 % aus der Aminosäure Glycin und besitzt eine sehr geringe α -Helix Wahrscheinlichkeit. Der C-Terminus bewirkt, daß das A1 im Gegensatz zum UP1 kooperativ an ssDNA bindet. Zudem ist die Bindung des A1 an einzelsträngige Nukleinsäuren etwa 100x stärker als die des UP1 (42). Im Gegensatz zum UP1 stimuliert A1 allerdings nicht die DNA-Polymerase α in vitro (39).

A1 als proliferationssensitives Protein

Das Protein A1 gehört zu den sogenannten proliferationssensitiven Proteinen, d. h. die Menge an A1 läßt sich korrelieren mit dem zellulären Wachstum (43-46). Isoliert man hnRNP-Komplexe aus sich exponentiell teilenden HeLa-Zellen oder Concanavalin A-stimulierten Rinder-Lymphozyten, so findet man ungefähr gleiche Mengen der Proteine A1 und A2 im hnRNP-Partikel. Die Menge an A1 reduziert sich auf etwa 1/3 bis 1/4 bei teilungsinaktiven, nichtstimulierten Zellen (Abb. 2). Es konnte gezeigt werden, daß eine Regulation der Menge an Protein A1 auf mRNA-Ebene stattfindet (46,47).

Die Proliferationsabhängigkeit des A1 ist schon früh mit einer möglichen Rolle des A1 bei der Regulation von hnRNA-Prozessierungsvorgängen verbunden worden (43). Eine Regulation der Prozessierung könnte eine Rolle beim Umschalten der Zelle vom ruhenden in einen proliferierenden metabolischen Zustand spielen (48-50).

Abb. 2: Mengenverhältnis der Proteine A1 und A2 im hnRNP-Komplex von ruhenden und stimulierten Zellen. hnRNP-Partikel wurden mit der Methode von Samarina (20) präpariert aus ruhenden und Concanavalin A stimulierten Rinder-Lymphozyten und mit SDS-PAGE analysiert. Die Lymphozyten wurden 0 h, 4 h und 40 h stimuliert (46). Der Anteil an Protein A1 nimmt drastisch zu etwa nach 40 h Stimulation, d. h. kurz bevor die Zellen sich anfangen zu teilen. (Bild von K. Melchers freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Zum Vergleich sind daneben hnRNP-Partikel aus sich exponentiell teilenden HeLa-Zellen aufgetragen (51).



Hypothese intronloser A1-Gene

hnRNP-Proteine stellen so etwas wie die "Histone" der hnRNA dar und besitzen zahlreiche Ähnlichkeiten mit Histonen. So sind sie relativ kleine, basische Proteine von hoher intranukleärer Konzentration (5-7,21-22). Das hnRNP-Protein A1 wird wie Histone proliferationsabhängig exprimiert und durch eine Multigenfamilie kodiert. Histon-Gene besitzen größtenteils keine Introns (52). In ruhenden, nicht proliferierenden Zellen weisen die hnRNP-Komplexe wenig A1 auf. Beim Übergang in den proliferierenden Wachstumszustand muß die Zelle plötzlich größere Mengen an hnRNA verarbeiten können. Da A1 wahrscheinlich essentiell für das RNA-Prozessieren ist (37), bringt es der Zelle einen Vorteil, wenn ein primäres A1-Transkript zur Verfügung steht, das nicht mehr umfangreich prozessiert werden muß. Dieses könnte in Analogie zu den Histonen von intronlosen Genen transkribiert werden. Auf diese Weise wäre die Zelle in der Versorgung mit A1-mRNA unabhängig vom Spleißapparat. Sobald die Menge an A1 in hnRNP-Komplexen ausreicht, können größere Mengen anderer hnRNAs prozessiert werden.

Ziele dieser Arbeit

Das hnRNP-Protein A1 ist ein wesentlicher Bestandteil der hnRNA-Prozessierungskomplexe und wird im Gegensatz zu anderen hnRNP-Proteinen zellwachstumsabhängig exprimiert. In Säugerzellen wird das A1 von einer Multigenfamilie kodiert. Die biologische Funktion des A1 in der hnRNP-Struktur und seine Beziehung zum Zellwachstum sind vollkommen unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Struktur von A1-Genen in der A1-Multigenfamilie und ihre Expression zu klären. Hierzu gehörte die Charakterisierung von A1-mRNAs und die Überprüfung der Hypothese, ob A1 in Analogie zu den Histonen von intronlosen Genen exprimiert wird.

Den Ausgangspunkt für diese Studien stellten A1-cDNAs sowie genomische Klone dar, die in unserem Labor bereits vorhanden waren. Es stellten sich folgende Aufgaben:

1. Die Sequenzanalyse der vorhandenen cDNAs und Identifizierung von A1-Isoformen.
2. Die Untersuchung der Expression von A1-Isoformen.
3. Sequenzierung des genomischen A1-Klons A1/15 und die Analyse möglicher Transkription von A1/15.
4. Die Untersuchung der A1-Genstruktur direkt aus genomischer DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion.

Von diesen Zielsetzungen abgesehen wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, über einen Ansatz mit anti-sense A1-Oligonukleotiden die biologische Bedeutung des A1 in vivo zu untersuchen.

3.1 Analyse von A1-spezifischen mRNAs

3.1.1 Isolierung von cDNAs

Eine cDNA-Bibliothek von poly(A⁺)-RNA aus humanen Hepatomzellen wurde mit dem A1-spezifischen Oligodesoxynukleotid A1,301 durchsucht (51). Die Sequenz von A1,301 5'-GCTGGAACCGCCATAGCCACCTTG-3' stammt aus dem A1-cDNA-Klon pRP10 (39) und ist komplementär zur A1-mRNA im Bereich der Aminosäuren 301-308. Mit dieser Sonde wurden 12 cDNA-Klone aus $1,5 \times 10^5$ rekombinanten Phagen der Hepatomabank isoliert. Die Längen der in λ gt11 inserierten cDNAs betrug 0,3 - 1,5 kb.

3.1.2 Restriktionskartierung von A1-cDNAs

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Restriktionskarte von zwei der größeren cDNA-Klonen 3C (0,7 kb) und 12L (1,2 kb) angefertigt. Die Kartierung zeigt, daß sich beide deutlich voneinander unterscheiden (Abb. 3). Die Karte von 3C stimmt mit dem humanen A1-cDNA-Klon pRP10 (39) überein. Die Restriktionskarte von 12L zeigt dagegen mehr Ähnlichkeit mit HDP-182, einer A1-cDNA isoliert aus einer Ratten-cDNA-Bank (54). HDP-182 besitzt zwei AccI-Stellen, von denen die mehr in 5'-Richtung gelegene Stelle in 12L zu finden ist, die 3'-Stelle indessen findet sich in 3C und pRP10. Die Restriktionsanalyse läßt somit den Schluß zu, daß mehr als ein Typ von A1-mRNA exprimiert wird. Allen Klonen gemeinsam ist eine HindIII-Stelle, die in pRP10 und ebenso in HDP-182 ziemlich genau am Ende der kodierenden Region liegt.

Um zu klären, ob die anderen Klone sich ähnlich unterscheiden lassen, wurde die DNA aller längeren Klone (> 0,7 kb) λ 3C, λ 5X, λ 6W, λ 7E, λ 9G, λ 10I und λ 12L mit SstI sowie mit XhoI verdaut (Abb. 4).

λ gt11 allein hat zwei SstI-Stellen, die Behandlung mit SstI ergibt drei Fragmente mit 20,7/18,6/4,4 kb (53). Eine mit der cDNA eingebrachte Sst-Stelle wird durch ein etwa 2 kb großes DNA-Fragment angezeigt. Die Analyse der Klone zeigt, daß außer 12L noch 10I ein solches Sst-Sst-Fragment aufweist (Abb. 4).

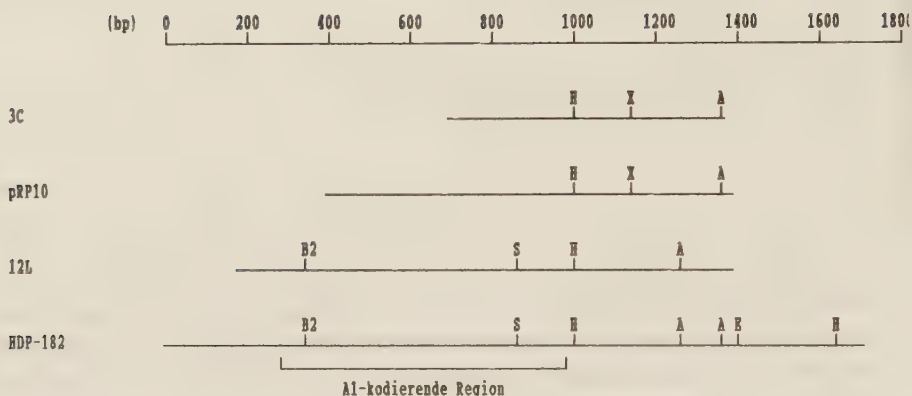


Abb. 3: Restriktionskarten der A1-cDNAs 3C und 12L und Vergleich mit den Karten anderer A1-cDNAs. Zwei Gruppen werden deutlich, zum einen 3C und pRP10 (39), zum anderen 12L und HDP-182 aus der Ratte (54). Restriktionsenzyme: A = AccI; B2 = Bgl2; H = HindIII; X = XhoI; S = SstI.

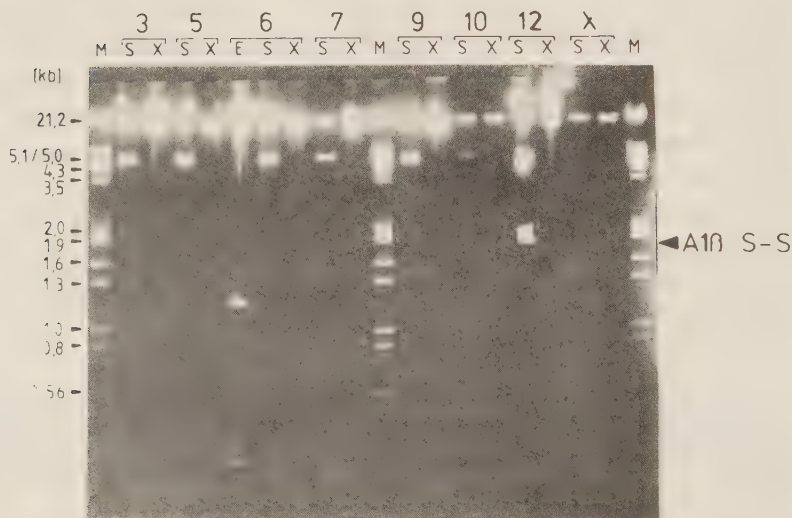


Abb. 4: Restriktionsanalyse von A1-cDNA-Klonen mit SstI und XhoI. M: Marker λ Sam7 x EcoRI x HindIII; 3: λ 3C; 5: λ 5X; 6: λ 6W; 7: λ 7E; 9: λ 9G; 10: λ 10I; 12: λ 12L; λ : λ Sam7. S: SstI; X: XhoI; E: EcoRI. A1β S-S zeigt das für 12L und 10I typische Sst-Sst-Fragment bei etwa 2 kb an.

Die Verdauung mit XhoI ergibt bei λ gt11 zwei Fragmente (31 kb und 12 kb), eine zusätzliche XhoI-Stelle in der cDNA führt zu einem Fragment von etwa 20 kb und zwei Fragmenten von je 12 kb. Die Klone 3C, 5X, 6W, 7E, 9G, weisen bei etwa 12 kb eine Doppelbande auf, erkennbar an der höheren Intensität der 12 kb-Bande verglichen mit der 20 kb Bande bei 10I, 12L und λ Sam7-DNA. Somit scheinen 7E und 9G zum gleichen Typ wie 3C und pRP10 zu gehören. λ Sam7 wurde zur Kontrolle aufgetragen. Er verfügt über nur je eine SstI und XhoI-Stelle (55).

HDP-182 besitzt eine EcoRI-Stelle im 3'-nichttranslatierten Bereich (54). Von den hier untersuchten Klonen teilt nur λ 6W dieses Merkmal und ist somit ein Kandidat für eine cDNA mit vollständigem 3'-Ende. Die EcoRI-Analyse der anderen Klone (51) ist hier nicht gezeigt.

3.1.3 Sequenzanalyse von A1 cDNAs

Die Strategie der Sequenzierung der A1-cDNAs ist gezeigt in Abb. 5. Die Insertionen der Klone λ 3C (0,7 kb), λ 5X (1,3 kb), λ 6W (1,5 kb) und λ 12L (1,2 kb) wurden in dieser Arbeit vollständig, die von λ 7E (0,95 kb) und λ 9G (0,95 kb) partiell sequenziert.

Es zeigt sich, daß alle untersuchten Klone A1-kodierende Sequenzen enthalten. Die Klone 7E und 9G stellen unvollständige Ausgaben von 3C und 5X dar und werden im folgenden nicht weiter beschrieben. Die Sequenz der anderen A1-cDNAs ist unterschiedlich und führte zur Einteilung der cDNAs in eine systematische Nomenklatur (siehe Tabelle 3). Es werden im folgenden nur noch die neuen Bezeichnungen benutzt.

A1-cDNA		Sequenzeigenschaft
Alte Bezeichnung	Neue Bezeichnung	
3C	A1 α (0,7)	sehr ähnlich pRP10 (35)
5X	A1 α	
6W	A1(ins)	enthält Insertion von 156 bp in A1-kodierende Region, ansonsten A1 α -Sequenz
12L	A1 β	Sequenz sehr ähnlich der HDP-182-Sequenz (Ratte)

Tabelle 1: Die Nomenklatur der A1-cDNA-Klone.

	871	880	890	900	910	920	930	940	950	960	968	
A1a	GAAGCAATTTTGGAGGTGGTGGAAAGCTACAATGATTTTGGGAATTACAACAATCAGCTCTTC											
A1(ins)	ATAACAACGGAGCGGAGCGGGCTTTGGCGGTGGTAGTG											
pRP10	-----G-----T-----T-----											
A1a(0,7)	-----G-----T-----T-----											
HDP-182	-----C-----C-----A-----											
A1B	-----C-----T-----T-----											
Protein A1	G S N P G G G G S Y N D F G N Y N Q S S											
Insprot	Y	N	N	G	G	G	G	P	G	G	S	S

260 270

	971	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1068
A1a	AAATTTTGGACCCATGAAGGAGGAAATTTTGGAGGCAGAAAGCTCTGGCCCCATATGGCGGTGGAGGCCAATACTTTGCAAAACACGAAACCAAGGTGGC										
A1(ins)	A	A	C	G	T	A	C	C	A	A	A
pRP10	A	A	C	G	T	A	C	C	A	A	A
A1a(0,7)	A	A	C	G	T	A	C	C	A	A	A
HDP-182	A	A	G	A	C	G	T	T	G	T	A
A1B	C	G	G	G	C	G	T	T	G	T	A
Protein A1	N	P	G	P	N	K	G	G	N	P	G

280 290 300

	1072	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1168
A1a	TATGGCGGTTCAGCAGCAGCAGTAGCTATGGCAGTGGCAGAAAGATTTTAATTA										
A1(ins)	GAAAACAAAGCTTAGCAGGAGAGGAGGCCAGAGAA										
pRP10	A-A-T-----GAGAG-----										
A1a(0,7)	A-A-T-----GAGAG-----										
HDP-182	A-G-C-----CAGCCA-----A-A-----GAGAG-----										
A1B	G-G-C-----CATAACAGCCA-----A-A-----GAGAG-----										
Protein A1	Y	G	G	S	S	S	S	Y	G	S	G

300 319

	1172	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1268
A1a	GTGACAGGGAAGCTACAGGTTACAACAGATTTGTGAAGCTCAGCCAAAGCACAGTGGTGGCAGGGCCTAGCTGCTACAAAGAAGACATGTTTATAGACAAATA										
A1(ins)	-----A-----										
pRP10	-----A-----										
A1a(0,7)	-----A-----										
HDP-182	-----A-----										
A1B	-----A-----										

	1272	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1368
A1a	CTCATGTGTATGGGCAAAAACTCGAGGACTGTATTTGTGACTAATTGTATAACAGGTATTTTAGTTTCTGTTCTGTGGAAAGTGTAAAGCATTCACAAC										
A1(ins)	-----A-----G-----T-----										
pRP10	-----A-----G-----T-----										
A1a(0,7)	-----A-----G-----T-----										
HDP-182	-----G-----C-----C-----T-----										
A1B	-----G-----C-----T-----										

	1372	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1468
A1a	AAAGGGTTTTAATGTAGA TTTTTTTTTT GCACCCCATGCTGTTGATTGCTAAATGTAACAGTCTGATCGTGCAGCTGAATAAATGT										
A1(ins)	A	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T
pRP10	A	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T
A1a(0,7)	A	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T
HDP-182	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C
A1B	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C

	1472	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1568
A1(ins)	AATGTGCTGTGTAAAGTTAGTCTACTCTTAAGCCATCTTGGTAAATTTCCCAACAGTGTGAAGTTAGAATTCCTTCAGGGTGATGCC										
pRP10	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA										
A1α(0,7)	AATGTGCTGTGT-----C--T-----T-----T-----										
HDP-182	TTTTTTTTT AATGTGCTGTGT-----C--G-----C-----G-----										
A1β	TTTTTTTTTTAAATGTGCTGTGT-----T--G-----C-----										

	1572	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1668
A1(ins)	AGGTTCTATTGGGAATTTATATACAACCTGCTGGGTGGAGAAGCCATTGTCTTCGGAACCTTGGTGTAGTTGAAGTATAGTTACTGTTGTGACCTGA										
HDP-182	-AA--C-----T--TGG--T-----AA-----T-C-A--CC-----A--T-A-										

	1672	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1768
A1(ins)	AGTTTCAACCATTTAAAGGGATTACCCAAGCAAAATCATGGAATGGTTATAAAAGTGATTCTTGGCACATCCTATGCAATATATCTAAATTGAATAATG										
HDP-182	TGA--T-----T-----TCAT--G--C--TT-----G-----ACA-----A-GAGA-----C-										

	1772	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1868
A1(ins)	GTACCAGATAAAATTATAGATGGGAATGAAGCTTGTCTATCCATTATCATGTGTAATCAATAACGATTTAATTCTCTTGAAAAA										
HDP-182	--CT-----A-G-----CAT-----C-----AATGGAIAAAAAAAAA										

Abb. 6: Kompilierung von A1-cDNA Sequenzen. Die Sequenz von pRP10 stammt von Riva et al. (39); HDP-182: (54); A1α, A1β, A1(ins), A1α(0,7): Diese Arbeit; Insprot: Aus A1(ins) abgeleitetes Protein. Nur die abweichenden Aminosäuren sind gezeigt. - bedeutet identisches Nukleotid; : zeigt die Deletion eines Nukleotides an und wurde eingefügt, um maximale Homologie zu erzeugen. Die Numerierung der Nukleotide ist bezogen auf ATG = +1. Die Insertion ist bei der Numerierung der Nukleotidsequenz mit einbezogen. Bei der Numerierung der Aminosäuren ist dagegen die Insertion nicht berücksichtigt. Das N-terminale Methionin ist im A1/UP1 (siehe Einleitung) nicht mehr vorhanden (38,39,50).

3.1.3.1 A1 α -cDNA

Die A1 α -cDNA (1302 bp) enthält die gesamte kodierende Region des Proteins A1 bis in den 5'-nichttranslatierten Bereich (5'-NTR) der A1-mRNA hinein. Die Sequenz besteht aus 21 bp 5'-NTR, 960 bp kodierendem Bereich und 321 bp 3'-nichttranslatiertem Bereich (3'-NTR) (Abb. 6). A1 α verlängert das 5'-Ende von pRP10 bis in den 5'-NTR und unterscheidet sich im weiteren, wenn man vom unvollständigen 3'-Ende absieht, nur durch ein Nukleotid im kodierenden Bereich (+744) und durch 4 bp im 3'-NTR. Es zeigt sich, daß die in A1 α kodierte Aminosäuresequenz nicht von der A1/UP1-Sequenz aus dem Rind (50) oder der Ratte (54) abweicht.

Die Sequenz endet kurz hinter dem AATAAA-Polyadenylierungs-Signal (2). Ein poly(A)-Bereich wurde nicht gefunden, deshalb ist die A1 α -cDNA am 3'-Ende wahrscheinlich nicht vollständig. Dies gilt auch für den 5'-nichttranslatierten Bereich von 21 bp, da Primer-Extensionsstudien an poly(A⁺)-RNA aus HeLa-Zellen einen 5'-NTR von 81 Nt ergeben (siehe Seite 18).

3.1.3.2 A1 α (0,7)-cDNA

Die A1 α (0,7)-cDNA besteht aus 683 bp. Die Sequenz beginnt bei Gly 226 der A1-Sequenz und endet 74 bp hinter dem ersten Poly(A)-Signal bei Position +1544 (Abb. 6). Somit benutzt die dieser cDNA entsprechende A1-mRNA wahrscheinlich das zweite mögliche Polyadenylierungssignal (54,57). Dieses Signal findet sich bei Position +1830 bei HDP-182 und A1(ins). A1 α (0,7) unterscheidet sich von A1 α im vergleichbaren Bereich nur um einen Thymidinrest im T-Kluster bei Position +1390. Die Abweichungen der A1 α -Sequenz von pRP10 (siehe oben) finden sich ebenso in A1 α (0,7).

3.1.3.3 A1 β -cDNA

Die A1 β -cDNA (1248 bp) stellt den zweiten Typ von A1-mRNAs dar (Abb. 6/7). Das offene Leseraster von 825 bp startet im Kodon von Valin 44 der A1/UP1-Sequenz und kodiert die Aminosäuren 45-319 von A1. Der 3'-NTR von 423 bp überstreicht das erste Polyadenylierungssignal und zeigt eine dem HDP-182 sehr ähnliche Sequenz von 82 bp, bevor die A1 β -Sequenz abbricht. Somit benutzt die entsprechende A1-mRNA wahrscheinlich die zweite Polyadenylierungsstelle, wie A1 α (0,7), A1(ins) und HDP-182 (54).

Die Nukleotidsequenz der kodierenden Region ist 92,9 % homolog zu der von A1 α . 57 Nukleotide (etwa 6 %) sind in der ersten oder dritten Position im Kodon verändert, ohne daß auch nur eine einzige der Aminosäuren von A1 ausgetauscht wird (Tabelle 2). Ein extremes Beispiel stellt Arginin 52 dar, welches bei A1 β von CGC, bei A1 α hingegen von AGA kodiert wird.

Vergleich	% Homologie	Abweichungen/verglichene bp
A1 α /A1 β	93.1	57/825
A1 α /HDP-182	92.5	72/960
A1 β /HDP-182	96.8	26/825

Tabelle 2: Vergleich von A1-cDNAs. Nur die Sequenzen der kodierenden Regionen sind einbezogen. In den 3'-NTRs der cDNAs sind die Abweichungen der Sequenzen größer (siehe Text).

Es zeigt sich, daß die A1 β -Sequenz dem HDP-182 aus der Ratte (54) homologer als der humanen A1 α und pRP10-Sequenz ist. Dies ergibt sich aus folgenden Punkten:

1.) Die Sequenzen der kodierenden Regionen von A1 β und HDP-182 sind zu fast 97% homolog, A1 α und A1 β dagegen nur zu 93 % (Tabelle 2). Etwa 70 % der ausgetauschten Basen bei A1 β sind identisch mit Nukleotidveränderungen in der Ratten-A1-Sequenz HDP-182, vergleicht man beide Sequenzen mit A1 α . Nur 26 Nukleotide sind dagegen verändert, wenn man die kodierenden Regionen von A1 β und HDP-182 vergleicht. 2.) Die Ähnlichkeit von A1 β und HDP-182 setzt sich im 3'-NTR fort. So sind gleich hinter dem TAA-Stoppkodon 10 bp inseriert, verglichen mit der α -Sequenz (vor Position +1123). Eine Insertion von 6 bp fällt bei HDP-182 an die gleiche Stelle. Zwei Cytosinreste sind bei A1 β und HDP bei +1388 inseriert und das Heptamer TTTTTTG ist bei Position +1394 im Gegensatz zu A1 α und A1 α (0,7) deletiert. 3.) Jeweils vor und hinter dem ersten Polyadenylierungssignal finden sich Kluster von 5-17 Thymidinresten. Bei A1 α (0,7), pRP10 und A1(ins) ist jeweils der 5'-Kluster größer als der 3'-Kluster. Bei A1 β und HDP-182 ist dies umgekehrt (siehe Abb. 7).

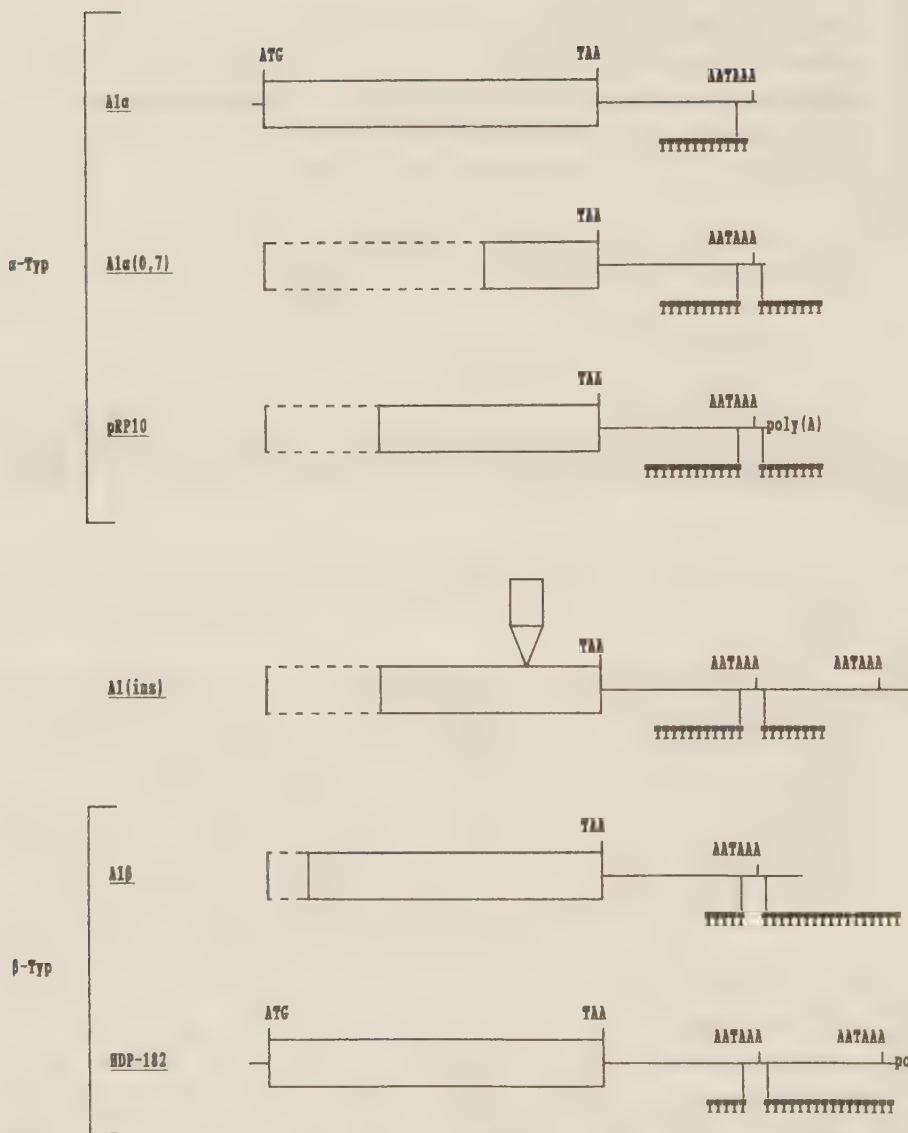


Abb. 7: Schematische Struktur der A1-cDNA-Sequenzen von Abb. 6. Je vor und hinter dem ersten Polyadenylierungssignal befindet sich ein Thymidin-Kluster. A1 α - und A1 β -Sequenzen unterscheiden sich in der Länge der Kluster. Bei der α -Gruppe war der erste T-Kluster größer als der zweite, wohingegen bei A1 β und HDP-182 der zweite Kluster länger ist. Die wahrscheinlichen 5'-Enden einzelner cDNAs sind angedeutet.

3.1.3.4 A1(ins)-cDNA

Die A1(ins)-cDNA (1466 bp) ist verwandt mit A1 α . Die Sequenz beginnt bei Leucinkodon 120 von A1 α und verläuft bis Aspartatkodon 249 identisch mit A1 α . Dann weicht die Sequenz ab. In Kodon 250 sind 156 bp einer homologen Sequenz inseriert. Da zwei Guanosinreste der Insertion vorangehen, diese aber auch die Insertionssequenz beenden, ist die genaue Stelle der Inserierung unklar. Anschließend läuft die Sequenz identisch mit A1 α weiter. Kein einziges Nukleotid außer der Inserierung weicht von der A1 α -Sequenz ab.

Das Leseraster wird durch die Insertion nicht verändert, ebenso ist die typische Domänenstruktur dieser Region im Protein A1 nicht verändert (siehe Diskussion).

Der 3'-NTR von A1(ins) beträgt 708 bp und ist homolog zum 3'-NTR von HDP-182. Die Ähnlichkeit mit dem 3'-NTR der kürzlich veröffentlichten A1-cDNA pRP15 (57) ist noch größer. Das 3'-Ende von A1(ins) geht über zwei Polyadenylierungssignale hinaus bis zu sechs Adenosinresten unmittelbar in 3'-Richtung der letzten Poly(A)-Stelle. Somit besitzt diese cDNA vermutlich ein vollständiges 3'-Ende.

Es stellte sich die Frage, inwieweit die durch cDNA-Klonierung charakterisierten A1-Transkripte A1 α , A1 β und A1(ins) in HeLa exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde aus HeLa-Zellen, wie im Methodenteil 6.3 beschrieben, RNA und poly(A⁺)-RNA isoliert und eine Northern-Analyse durchgeführt.

Die Hybridisierung mit dem A1,301-Oligonukleotid zeigt zwei mRNA-Formen bei etwa 1,5 und 1,8 kb (Abb. 8). Die Bande bei 1,8 kb hat eine geringere Intensität, verglichen mit der kürzeren Bande. Ein ähnliches Muster an A1-mRNAs erhält man bei Hybridisierung mit A1-cDNA, unabhängig vom Gewebe (57) sowie vom zellulären Wachstumszustand boviner Lymphozyten (46). Die beiden Signale der A1-mRNA entstehen durch differentielle Polyadenylierung der Transkripte, wie vor kurzem gezeigt werden konnte (57).

Die A1,301-Probe kann nicht zwischen A1 α - und A1 β -mRNAs unterscheiden. Um eine Analyse von α/β -A1-mRNAs durchzuführen, wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert, die durch zwei Nukleotidaustausche spezifisch für den einen oder anderen Typus waren (Tabelle 3). Die Hybridisierungsbedingungen wurden so gewählt, daß nur perfekte Basenpaarungen möglich waren (58). Es zeigt sich, daß in HeLa-Zellen praktisch alle zum A1,301-Oligonukleotid komplementären A1-mRNAs dem α -Typ, und wenige oder gar keine dem β -Typ zuzuordnen sind (Abb. 8).

Zur Untersuchung der Expression von A1(ins)-mRNAs wurde ein Oligonukleotid eingesetzt, welches zum Übergang A1 α $\rightarrow$ Insertsequenz komplementär ist (A1,248/ins; Tabelle 3). Hybridisierung mit der A1,248/ins-Probe zeigt zwei schwache Signale mit etwa 0,2 kb höherem Molekulargewicht als die A1-Signale von A1,158g. Dieses Ergebnis korrespondiert gut zur erwarteten Länge von A1-mRNAs plus 156 Basen der Insertsequenz. Die A1(ins)-mRNA wird nur schwach exprimiert. Dies erklärt, warum bei der Hybridisierung mit A1,301 nicht auch die A1(ins)-Signale entstehen. Oligonukleotid A1,158g bindet an eine Isoform der A1-mRNAs (siehe Abb. 16; Seite 30) und wurde als Marker an poly(A⁺)-RNA in demselben Gel hybridisiert.

Die Spezifität der hier durchgeführten Northern-Analysen mit Oligonukleotiden wurde in einer Serie von "Dotblot"-Experimenten überprüft durch Hybridisierung an die korrespondierenden cDNAs (nicht gezeigt).

Oligo-nukleotid	Position auf A1-mRNA ¹⁾	Sequenz (5' - 3')	Quelle
A1,124 α	124-129	TTTCCATACTGTTCAAA	A1 α
A1,124 β	124-129	TTCCCATACTGCTCAAA	A1 β
A1,158g	158-163	ATGACAGTCTTATCCAC	A1/15
A1,248/ins	248-252	ATAACCACCATCATY	A1(ins)
A1,301	301-308	GCTGGAAACGCCATAGCCACCTTG	pRP10 ²⁾

¹⁾ Position in Aminosäuren auf Protein A1 ohne Met 1; ²⁾ Riva et al. (39).

Tabelle 3: Synthetische Oligonukleotid-Proben, Lokalisation auf A1/A1(ins)-mRNA und die Herkunft der Sequenzen. A1,124 α ist spezifisch für die A1 α -cDNA und unterscheidet sich von A1,124 β durch zwei Nukleotidaustausche (unterstrichen). A1,301 unterscheidet sich nicht zwischen A1 α / β ; mit dieser Probe wurden die hier beschriebenen cDNAs isoliert (51). A1,158g wird in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Die Sequenz des 15mers A1,248/ins liegt gerade auf der Grenze des Inserts und überlappt mit Insert- und A1-Sequenz.

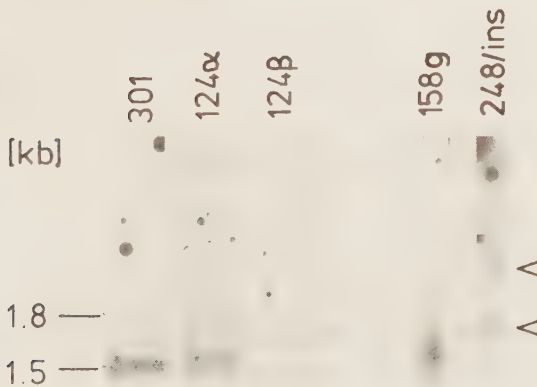


Abb. 8: Northern-Analyse von A1-mRNAs. Entweder 5 μ g HeLa-poly(A⁺)-RNA wurde auf Nylonmembran transferiert und mit Oligonukleotiden hybridisiert (A1,301; A1,124 α ; A1,124 β) oder 1 μ g poly(A⁺)-RNA wurde in situ hybridisiert (A1,158g; A1,248/ins). Hybridisierung und Waschschrirte wurden unter stringenten Bedingungen durchgeführt (siehe 6.3.3), und in einer Serie von "Dotblot"-Experimenten überprüft (nicht gezeigt).

Zur Klärung der Länge des 5'-NTRs von A1-mRNAs wurde eine "Primer-Extensions"-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde das zur mRNA im Bereich von Kodon 3-7 (Lys-Pro) komplementäre Oligonukleotid A1,2 sowie in einem parallelen Experiment Oligonukleotid A1,32 an poly(A⁺)-RNA aus HeLa hybridisiert (siehe Tabelle 4). Anschließend wurden die "Primer" mit Reverser Transkriptase bis zum 5'-Ende der mRNA verlängert. Die Länge der Syntheseprodukte wurde auf einem Polyacrylamidgel mit einem Sequenzierungsansatz als Längensstandard analysiert (Abb. 9).

Das Experiment zeigt, daß A1,2 von der Reversen Transkriptase auf 112 ($\pm$ 1) nt verlängert wird. Daraus ergibt sich ein 5'-NTR von 89 ($\pm$ 1) nt. Im Fall des A1,32 wird ein Extensionsprodukt von etwa 202 ($\pm$ 1) nt erwartet. Tatsächlich aber wird bei A1,32 eine cDNA von 181 ($\pm$ 1) Nt beobachtet (Abb. 9), was einem 5'-nichttranslatierten Bereich von 68 ($\pm$ 1) Nt entspräche.

Zwei Möglichkeiten erklären die beobachtete Diskrepanz bei den 5'-NTRs. Erstens könnte die Verlängerung des A1,32 aufgrund von Sekundärstrukturen der mRNA nicht vollständig gewesen sein, was ein typisches Problem von Primer-Extensionsexperimenten darstellt (59). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, daß gelegentlich auch bei der Extension mit A1,2 eine kürzere Bande als 112 nt beobachtet wurde (nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß das A1,32, welches ein Gemisch aus 32 verschiedenen DNA-Sequenzen darstellt, an andere A1-mRNAs hybridisierte, die ein kürzeres 5'-Ende aufwiesen. Somit würde die Extension von A1,2 nur eine Untergruppe von mRNAs anzeigen. Diese Frage kann schlüssig nur durch die Klonierung weiterer A1-cDNAs beantwortet werden.

Oligo- nukleotid	Position auf A1-mRNA ¹⁾	Sequenz (5' - 3')	Quelle
A1,2	2-7	TTAGGAGACTCTGACTT	A1a
A1,32	32-37	C C G G CCCCATTGTTCAAATGC	Aminosäuresequenz UP ²⁾

¹⁾ Position in Aminosäuren des Proteins A1 ohne Met 1;

²⁾ Williams et al. (50)

Tabelle 4: Zur "Primer-Extensions"-Analyse eingesetzte Oligonukleotide.

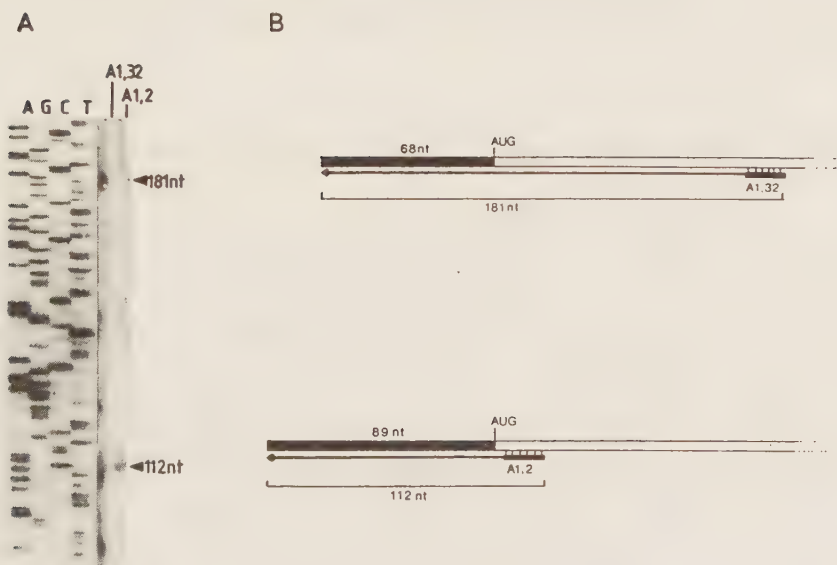


Abb. 9: Primer-Extensions-Analyse von A1 mRNA. (A) Die Oligonukleotide A1,2 und A1,32 wurden kinasiert und an HeLa-poly(A⁺)-RNA hybridisiert, wie in Methoden (6.3.4) beschrieben, sodann mit M-MLV Reverser Transkriptase in Gegenwart aller vier dNTPs verlängert. Die Syntheseprodukte wurden auf einem 4,2 % Polyacrylamid-Gradienten-Gel aufgetrennt. Die Autoradiographie dauerte 10 Tage bei -70°C mit einer Verstärker-Folie. Der Marker-Sequenzierungsansatz AGCT wurde nur 16 h belichtet. (B) Abgeleitete Länge des 5'-NTR (schwarzer Balken) von A1 mRNA. Je nach Oligonukleotid ergab sich 89 Nt (A1,2), oder 68 Nt (A1,32). Weißer Balken: kodierender Bereich.

3.2 Die Genstruktur des hnRNP-Proteins A1

3.2.1 Genomische Organisation von A1-Sequenzen

Das hnRNP-A1 wird von einer Multigenfamilie kodiert. Dies zeigt die Southernanalyse von genomischer DNA aus Mensch, Rind oder Ratte mit A1-cDNA als Probe. Komplexe Bandenmuster finden sich in allen drei Spezies (46,54,57).

Die Anzahl der Banden reduziert sich auch nicht bei Verwendung verschiedener A1-Oligonukleotidproben, welche nicht mit Restriktionsfragmenten überlappen können (siehe Abb. 17, Seite 31). Die Anzahl der Banden wäre vereinbar mit etwa 20 A1-Genen oder A1-Pseudogenen.

Die Analyse der A1-cDNA-Klone (Kapitel 3.1) ergab, daß wenigstens zwei A1-Gene existieren. Zudem konnten Isoformen wie A1(ins) nachgewiesen werden. Die A1(ins)-mRNA könnte entweder durch alternatives Spleißen eines A1-Gens entstehen oder von einem distinkten Gen transkribiert werden.

3.2.2 Isolierung und Charakterisierung genomischer A1-Klone

Eine genomische Bibliothek von humanen Blutzellen wurde von K. Melchers nach A1-Genen mit dem A1,301-Oligonukleotid durchsucht (46). Um mögliche Sequenzisoformen des A1 zu berücksichtigen, war die Hybridisierung unter relativ unstringenten Bedingungen durchgeführt worden. 36 Klone wurden isoliert und analysiert durch Hybridisierung mit weiteren A1-Oligonukleotiden vom N- bis zum C-terminalen A1-Bereich. Fünf Klone hybridisierten mit allen Oligonukleotiden, und waren somit Kandidaten für vollständige A1-Gene. Nur A1 α -spezifische A1-Oligonukleotide (siehe 3.1.3) hybridisierten mit diesen Klonen, nicht aber das A1,124 β -Oligonukleotid (siehe Tabelle 3). Somit war wahrscheinlich kein A1 β -Gen isoliert, sondern nur A1 α -Gene. Die fünf λ -Klone wurden deshalb als (A1) α -Klone bezeichnet (46).

Die Southernanalyse der HindIII-verdauten genomischen α -Klone mit A1 α (0,7)-cDNA ergab zwei hybridisierende Restriktionsfragmente. Die HindIII-Stelle trennt in allen bekannten A1-cDNAs den kodierenden Teil vom 3'-NTR (siehe 3.1.3). Somit mußten auch 3'-NTR-Sequenzen in den α -Klonen vorhanden sein. Die Restriktionskarten aller fünf Klone zeigten, daß lediglich Klon A1/2 und A1/6 verwandt zu sein schienen (Abb. 10). Keine der Restriktionskarten stimmte mit den Karten der A1-cDNAs vollständig überein. Mit dem

Klon A1/15 hybridisierten alle Oligonukleotide mit einem nur 1,2 kb großen BamHI-HindIII Restriktionsfragment. Somit konnte nur ein A1-Gen ohne Introns in der kodierenden Region in A1/15 vorhanden sein, was in Übereinstimmung mit der Hypothese der intronlosen A1-Gene (siehe Einleitung) wäre. Deshalb wurde der Klon A1/15 zur Sequenzierung herangezogen.

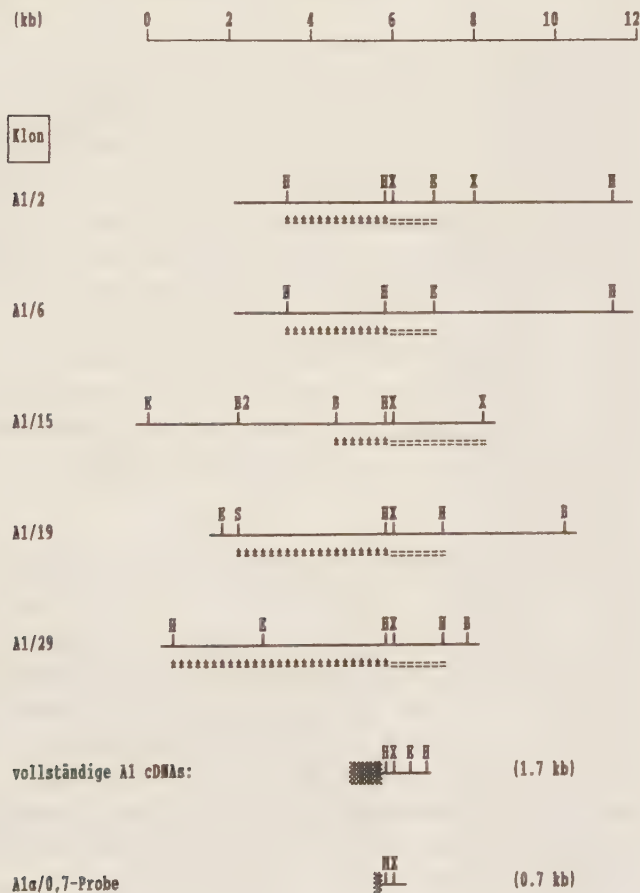


Abb. 10: Restriktionskarte und Hybridisierungsanalyse der genomischen α-Klone. Alle Karten sind in 5'-3' Richtung angegeben, bestimmt durch die Hybridisierung mit A1α(0,7)-cDNA (siehe Seite 14). Restriktionsschnittstellen: B = BamHI; E = EcoRI; H = HindIII; X = XhoI. **** zeigt ein Restriktionsfragment an, welches mit allen A1-Oligonukleotiden der kodierenden Region sowie mit der A1α(0,7)-cDNA hybridisiert. ==== zeigt ein Fragment an, welches nur mit A1α(0,7) hybridisiert und demzufolge Sequenzen des 3'-nichttranslatierten Bereichs von A1 enthält. ≡ = kodierender Bereich der cDNA. (Verändert aus: Melchers, (46)).

Beide Stränge der kodierenden Region von A1/15 wurden sequenziert und jedes Nukleotid dieses Bereichs wenigstens dreimal bestimmt (Abb. 12). Typische Sequenzierungsergebnisse sind dargestellt in Abb. 11. Die ersten Sequenzierungsarbeiten wurden in Kollaboration mit K. Melchers (Byk Gulden, Konstanz) durchgeführt, eine partielle A1/15-Sequenz findet sich bei Melchers (46).

Die Sequenzanalyse zeigt, daß A1/15 keine Introns enthält und kolinear zur A1-cDNA verläuft (Abb. 13). Nur 11 von 1310 bp verglichen mit A1 α sind verändert. Die A1-Sequenz ist flankiert mit sogenannten "direct repeats" von 10 bp. Unmittelbar vor dem 3'-Repeat finden sich die Reste einer Poly(A)-Sequenz. Diese Merkmale sind zusammen mit der intronlosen Struktur typisch für ein Retropseudogen, welches aus einer mRNA durch reverse Transkription mit nachfolgender Reintegration in das Genom entstanden sein könnte (60).

Das Leseraster ist intakt und kodiert ein dem A1 ähnliches Protein von 321 Aminosäuren. Interessanterweise dehnt sich der Rahmen weiter in 5'-Richtung des A1-Startkodons aus bis zu Position -131 (Numerierung bezogen auf ATG des A1 = +1), so daß insgesamt ein freier Leserahmen von 1089 bp (365 Aminosäuren) vorliegt.

Das aus der Retroposonsequenz resultierende Protein (vom A1-Startkodon an gerechnet) ist dem A1 sehr ähnlich bis zu Glutamin 302. Eine drastische Änderung der weiteren Aminosäuresequenz wird dann durch den Wegfall des Guanosins bei Position +907 bewirkt. Diese Rasterverschiebung führt allerdings nicht zu einem vorzeitigen Stoppkodon, sondern es resultiert ein neues Leseraster, welches 4 bp nach dem A1-TAA-Kodon mit einem TAG endet. Die abgeleitete Aminosäuresequenz nach Gln 302 ist sehr hydrophob, im Gegensatz zum hydrophilen A1-Carboxyterminus. Zusätzlich werden zwei Argininreste des Proteins A1 in Aspartat und Glutamat ausgetauscht, so daß man einen deutlich niedrigeren isoelektrischen Punkt für das putative A1/15-Protein erwarten würde. Mit PCGENE berechnet sich ein isoelektrischer Punkt von etwa 8,7, d. h. eine pH-Einheit niedriger als beim Protein A1 (pI = 9,7; (34)). Von der Leserasterverschiebung abgesehen sind nur zwei Aminosäuren des A1 verändert; aus Isoleucin 161 wurde bei A1/15 ein Threonin und aus Arginin 231 ein Histidin.

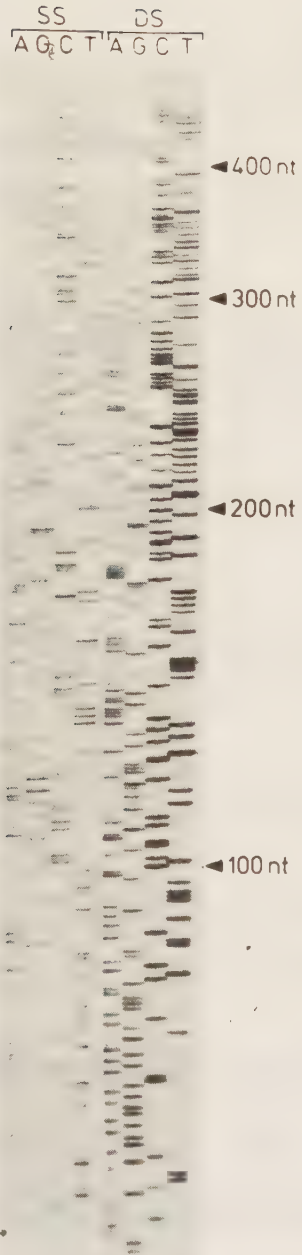


Abb. 11: Sequenzanalyse des Klons A1/15. Dargestellt ist je ein AGCT-Sequenzierungsansatz des 5'-Endes von A1/15 mit M13-DNA (SS) und des 3'-Endes mit doppelsträngiger Plasmid-DNA (DS) (siehe 6.2.2.4). Verwendet wurde ein Dickegradienten-Gelsystem, das zur Kompression der Banden und somit zu einer verbesserten Auswertung führte. Unter Verwendung von Sequenase und $\alpha\text{-}^{35}\text{S}$ dATP konnten routinemäßig 300-400 Basen mit hoher Sicherheit aus einem Ansatz gelesen werden.

A1/15 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590
 A1a TTCAGAAATACCACTCTGTGAATGGCCACAACCTGTGAAGTTAGAAAAGCCCTGTCAAAAGCAAGAGATGGCTAGTGTCTTCATCCAGCCAAGAGGTGGAAG
 Protein A1/15 I Q K Y H T V N G H N C E V R K A L S K Q E N A S A S S S Q R G R S
 170 180 190

A1/15 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690
 A1a TGGTTCTGGAAACTTTGGTGGTGGTCTGTGGAGGTGGTTTCGGTGGGAATGACAACTTCGGTCTGGAGGAAACTTCAGTGGTCTGGTGGCTTTGGTGGC
 Protein A1/15 G S G N F G G R G G G F G G N D N F G R G G N F S G R G G F G G
 200 210 220

A1/15 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790
 A1a AGCCATGTGGTGGTGGATATGGTGGCAGTGGGCTATGCTAATGGATTGGTAATGATGGAAGCAATTTTGGAGCTGGTGGAACTTACATGATTTTG
 Protein A1/15 S H G G G G Y G G S G D G Y N G F G N D G S N F G G G G S Y N D F
 Protein A1 R
 230 240 250 260

A1/15 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890
 A1a GCAATTACAACAATCAGCTCTTCAAAATTTGGACCCATGAAGGGAGGAAATTTTGAGGGCAGAAGCTCTGGCCCTATGGCGGTGGAGGCCAATACTTTGC
 Protein A1/15 G N Y N N Q S S N F G P N K G G N F G G R S S G P Y G G G G Q Y F A
 270 280 290

A1/15 900 910 920 930 940 950 960 970 HindIII 990
 A1a AAAACCCAGAAACCAAGTGGCTATGGCGGTCCAGCAGCAGCAGTACGTATGGCAGTGGCAGAGAATTTTAATAGGAAACAAAGCTTAGCAGGAGAGG
 Protein A1/15 K P R N Q V A N A V P A A A V A N A V A E D F N End
 Protein A1 Q G G Y G G S S S S S S Y G S G R R F End
 300 310

A1/15 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090
 A1a AGAGCCACAGAAAGTGACAGGGAAGCTACAGGTTTCAATAGATTTCTGAACTCAGCCAGCAGCAGTGGTGGCAGGCTTAGCTGTACAAAGAACATGT
 A1/15 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 A1a TTTAGACAAATACTCATGTGTATGGGCAAAAACCTCGAGGACTGTATTTGTGACTAATTGTATAACAGGTTATTTAGTTTCTGTTCTGTGGAAGTGTA
 A1/15 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290
 A1/15 AAGCATTCACAAAGGGTTTAACTAGATTTCTTTTGCACCCCAATGCTGTGATTGCTAAATGTAATAGTCTGATCGTGATGCTGAATAATGTC
 A1a -----T-----TT-----C-----

A1/15 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390
 A1/15 TTTTTTTTTTAAAAAAGAAAAAGAAAAATCTCAGTACAATATACCTATTTCCTCTGTGAGCCATGAGAATTGAAATAACGGGGATAGTGAACAC
 A1/15 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490
 A1/15 CTGGGGTGGAAAGAACTGTGCTCCCACTAAGGGAGGTGGAGGGAGGAGTGCCTTGTGCTCTTGACTGTGAGGTGGGTCTCTAGGAAGTTAACAGCT
 A1/15 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590
 A1/15 GAGGGAGAACTGTGTGGGGCTCCCTCTGCTCTGGGTAGGGCTTACTCCAGCCCATCCCCCCTCTCTTGTGCCACTGATAGCCTTGTCTCAAGGGGG
 A1/15 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690
 A1/15 GCACCAGAACTTCTTAGCTTGGCTCTTCCCAGGTGGTCTCAGCTGTACCCAGAAGAGAAGTACCAGGAGCTGGAAGTGGAATAGGGACCGGTAAACCAAGCGA
 A1/15 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790
 A1/15 TCAGTGGGCACAGGCTGGGATGAAAGAGAGAGAAGGATAAGATACTACTTGGGTGGGCCAGGCACAGTGGCTCACACCTGTAAATCCAGCAGCTTTGAGA
 A1u-Klon Blur2: --GG--GTG-A-----AT-----CG--

A1/15 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 GGGCGAGGCAGGTGGATCA GAGGTGAGGAGATCGAGACCATCTGGCTAACTGGTGAACCCCGCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCAGGC
 -T-T-TG-----A-TT-C-----T-A-----G-T-A-C-----A-----G-----G

A1/15 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990
 ATGGTGCGCGGGCGCTATATCTCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCTGAACCTGGGAGGTGGAACTTGCACTGAGCCAAAGATGGAGCCA
 C-----AC--A--G-AC-----A-----A-T-----CTA--CA--GG-----G--CAT--T-

A1/15 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090
 CTACGCTCCAGCCTGGGCAACACAGTGAAGACTCTGCTCTCAAAATACAAAATAAAAAAAGATAGTACTTGGTGGTGATCACCTTCTGCCACCCAGTT
 -GT-----G-----T-CA-----A-A--G- (Blur 2)

A1/15 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190
 TAGCTCAGTGATGCTCGGGGTAGGAAGTCATCAGTTGCTTTGACATGATGCTGGAGACAGACATTCTACAGAGGTAGAAGTGGGAGGTAGTAAGGAAC

A1/15 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290
 CCAGACCCCTTGGCCTAACAGATCCTACACCAGCTCTCTGAGCCAGGGTTATTGACTCATCTGGAGCCTCACCAGGCTGGGCTGGTAGCAGGGACCTGA

A1/15 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 XbaI 2390
 GACCCAGAGAATCTGCAATTAGGACATGATATCTCCAGACCCCGGGCTGACCTCCATGATACATCCCACTCCCATCTCTAGATTGGGACAG

A1/15 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490
 ACCTTCTCTATAGGCACCATCCCCCAACAACCCATCTTCCAGTCCTCTATCTCTGCGCAGTGATCAGGCAGGCATGAAGGCGAGCCTTCAGTACT

A1/15 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590
 GCCCTCATACAGATGGGAACACCTAGCTGACTGACTGACCACTGCTCTAGGTGGACAGCAGCTGGAATGATAGCTTCATAGACATCAGCTGAGCAG

A1/15 2600 2610 2620 2630 2640 2650
 CCCATCCAATCAGGTCTCTCTACCAACTTTTACCTGTTTGCTACTCAGGTACCAACCTGGC

STRUCTURE OF THE A1 PSEUDOGENE A1/15:

Abb. 14: Schematische Darstellung des A1/15-Retroposons. Die Numerierung wurde bezogen auf ATG des A1 = + 1. Weiterhin ist die Länge der kodierenden Region und die Entfernung Stoppkodon-Poly(A)-Signal angegeben. Die "direct repeats" sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu. Von den beiden T-Klustern (siehe Abb. 7; Seite 16) ist nur der 3'-Kluster dargestellt.

Berücksichtigt man das gesamte offene Leseraster, das sich über den 5'-"direct repeat" hinaus erstreckt, so wird ein Protein von 365 Aminosäuren (39,5 kDa) mit einem pI von etwa 9,7 (berechnet mit PCGENE) kodiert. Die zusätzlichen 42 N-terminalen Aminosäuren zeigen kaum Homologie zu den verbleibenden 321 C-terminalen. Dieser Leserahmen erfüllt wahrscheinlich keine biologische Funktion (siehe Diskussion).

Anzumerken ist, daß die Rastermutation bei +907 in den Bereich der Sequenz des A1,301-Oligonukleotids fällt und sich infolge des fehlenden Guanosins von A1/15 nicht alle Basen paaren können. A1/15 wurde wie die A1-cDNAs mit A1,301 isoliert. Die A1-cDNAs weisen dagegen alle die perfekte A1,301-Sequenz auf. Dies weist auf die unterschiedliche Isolierungsmethode von A1/15 und den cDNAs hin. Das Retroposon wurde mit relativ unstringenten Bedingungen bei Hybridisierung und nachfolgend stringenten Waschbedingungen isoliert (46). Diese Methode läßt somit begrenzte Fehlpaarungen zu. Die cDNA-Klone wurden hingegen unter stringenten Bedingungen sowohl bei Hybridisierung und Waschen isoliert (51), was wahrscheinlich keine Fehlpaarung zuließ.

Alu-Element im 3'-Bereich von A1/15

Ein Alu-repetitives Element (61) wurde im 3'-Bereich von A1/15 gefunden, beginnend bei Position +1746, d. h. 782 bp nach dem TAG-Stoppkodon (Abb. 15). Das A1/15-Element ist z. B. mit dem Klon Blur2 (61) über eine Länge von 301 bp zu 80 % homolog.

Alu-Elemente stellen Pseudogene der 7SL-RNA dar und sind etwa 500000-fach im menschlichen Genom repetiert (60). Das Element besteht typischerweise aus zwei Kopf-Schwanz verbundenen homologen Regionen von ungefähr 130 bp. Am 3'-Ende jeder Sequenz findet sich eine adenosinreiche Region. Die 3'-Hälfte des Alu besitzt eine Insertion von 33 bp.

	1751	1760	1780	1800	1820	1836
A1/15	GCCAGGCACAGTGGCTCACACCTGTAATCCAGCACTTTGAGAGGCCGAGGCAGGTGGATCAGGAGTCCAGAGATCGAGACCATCC					
A1/15	-----TG-----GGG-G-----A--G-----TAC-C-G-----A-A--GG--T-AA-CT-G--GGTG--A-T-G-					
	1887	1900	1920	1940	1960	1970
	1840			1860		1880
A1/15	TGGCTAACATGGTGAACCCG-----GTCTCTACTAAAAATACAAAAAA					
A1/15	A-TGAGC--A-A--G-G--A-TACACTCCAGCCTGGGCAACACAGTGAGACTCT-----T-					
	1974	1990	2010	2030	2041	

Abb. 15: Vergleich des A1/15 Alu-Elements in sich. Das Alu-Element besteht aus zwei Wiederholungen, wenn die Sequenz von 1748 bis 1877 mit der Sequenz von 1884 bis 2050 verglichen wird. Beide Bereiche tragen ein Poly(A)-Ende. Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung dargestellt. Identisches Nukleotid: -; Deletion: .

Retropseudogene werden normalerweise nicht transkribiert (60-63). Es konnten mittlerweile aber auch Ausnahmen von dieser Regel beschrieben werden (64-68).

Um eine mögliche Expression von A1/15 zu untersuchen, wurde das Oligonukleotid A1,158g synthetisiert, welches eine A1/15-spezifische Mutation trägt (siehe Tabelle 3, Seite 19). Auf Position +485 findet sich bei A1/15 ein ACT (Threonin) statt eines ATT (Isoleucin). Dieser Austausch findet sich weder bei den humanen cDNAs A1 α , A1 β , A1(ins), noch bei von anderen Gruppen beschriebenen A1-cDNAs (39,54,57) (siehe Abb. 6).

Northern-Analyse von HeLa poly(A⁺)-RNA mit A1,158g zeigt die beiden A1-typischen Banden bei 1,5 und 1,8 kb (Abb. 16). Somit werden A1-mRNAs, die die A1/15-Mutation tragen, in HeLa-Zellen exprimiert. Als Marker wurde in diesem Experiment A1,301 eingesetzt. Die Bedingungen waren so gewählt, daß das A1,301-Oligonukleotid an die A1/15-Sequenz einer mRNA ohne Guanosin +907 hybridisieren kann, das A1,158g-Oligonukleotid aber nur an seine genau komplementäre Sequenz (siehe Legende von Abb. 16). Die Quantifizierung der Autoradiographie des Gels (LKB Ultra-Scan) ergab, daß etwa 15 % der A1-mRNAs die A1/15-Mutation tragen (nicht gezeigt).

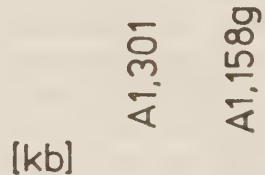


Abb. 16: Northern-Analyse von HeLa-poly(A⁺)-RNA mit dem A1/15-spezifischen Oligonukleotid A1,158g. Je 1 µg RNA wurde auf einem 1 % Agarose/Formaldehyd-Gel elektrophoriert und anschließend *in situ*, wie in Methoden beschrieben, mit den Oligonukleotiden A1,301 und A1,158g bei 45°C/0,9 M NaCl hybridisiert und unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Diese Konditionen sind für das 17mer A1,158g stringent, für das 24mer A1,301 weniger stringent. Die Bedingungen wurden im gleichen Gel mit denaturierter Plasmid-DNA mit und ohne A1/15-Mutation überprüft (nicht gezeigt). Autoradiographie: 4 Tage.

Unklar ist allerdings, warum zwei A1-mRNA-Formen bei der Northern-Analyse erscheinen. Da A1/15 im 3'-Bereich keine zwei AATAAA-Polyadenylierungsstellen entsprechenden Abstand besitzt, würde man nur eine mRNA bei etwa 1,5 kb erwarten. Somit ist es unwahrscheinlich, daß die zwei mRNA-Signale von 1,5 und 1,8 kb durch Transkription des Retroposons entstehen. Hierfür spricht auch, daß die Northern-Analyse mit einem Oligonukleotid komplementär zu einem Bereich in 3'-Richtung des A1/15-AATAAA bei Position +1281 negativ blieb (nicht gezeigt). Allerdings könnte Transkription von A1/15 zu dem 1,5 kb-Signal beitragen.

3.2.5 Genomische Organisation von A1/15-Sequenzen

Um zu klären, ob die im Northernexperiment nachgewiesenen mRNAs von dem Retrogen A1/15, wurde eine Southern-Analyse von humaner DNA mit A1,158g und A1,301 durchgeführt. Die Bedingungen waren denen des Northern-Experiments (Abb. 16) gleich und wurden in "Dotblot"-Experimenten kontrolliert (nicht gezeigt). Mit beiden Proben lassen sich etwa 20 Signale nachweisen (Abb. 17).

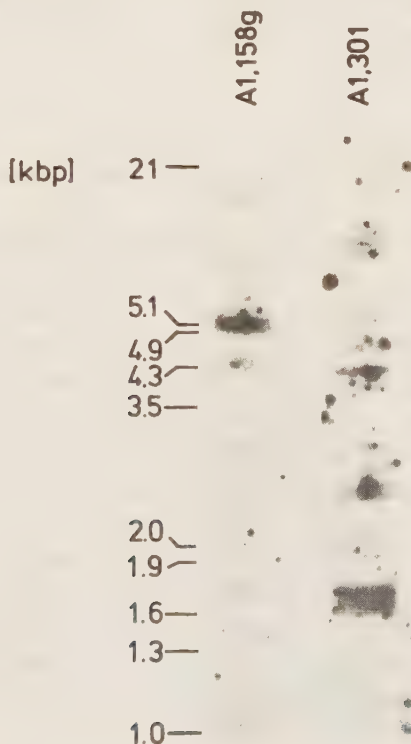


Abb. 17: Genomische Southern-Analyse von menschlicher Placenta-DNA mit A1,301 und A1,158g. Die DNA wurde mit EcoRI und HindIII verdaut und, wie in der Legende zu Abb. 16 beschrieben, unter stringenten Bedingungen hybridisiert und gewaschen.

Bei A1/15 liegen die zu den Oligonukleotiden komplementären Sequenzen auf einem etwa 6 kb EcoRI-HindIII-Restriktionsfragment (Abb. 10). Somit wurde erwartet, daß in diesem Bereich bei beiden Oligonukleotiden das gleiche Fragment hybridisiert. Dieses Signal findet sich, daneben hybridisieren allerdings zahlreiche andere Restriktionsfragmente. Das Muster der hybridisierenden Fragmente und die Intensitätsverteilung ist bei beiden Oligonukleotiden deutlich verschieden.

Zusammengefaßt läßt sich aus diesem Experiment folgendes schließen. 1.) Auch die in den bislang isolierten A1-cDNAs nicht vorkommende Mutation bei +485 (Abb. 13) ist im humanen Genom etwa 20 mal wiederholt. 2.) Im Gegensatz zu A1/15 liegen die Oligonukleotidsequenzen auch auf verschiedenen Restriktionsfragmenten, was auf intronhaltige A1-Gene neben intronlosen Sequenzen hinweisen könnte.

Um zu klären, ob die A1/15-Mutation auch in den anderen genomischen α -Klonen (Abb. 10) vorkommt, wurde eine Hybridisierung mit A1,158g durchgeführt. Es zeigte sich in Übereinstimmung mit der Häufigkeit dieser Sequenz im Genom, daß vier der fünf α -Klone mit dieser Probe hybridisieren. Lediglich der Klon A1/29 hybridisierte nicht (Daten nicht gezeigt).

Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß die im Northern-Experiment angezeigten A1-mRNAs mit der A1/15-Mutation nicht von dem Retroposon, sondern von einem anderen A1-Gen transkribiert werden.

3.2.6 Promotoranalyse des 5'-Bereichs von A1/15

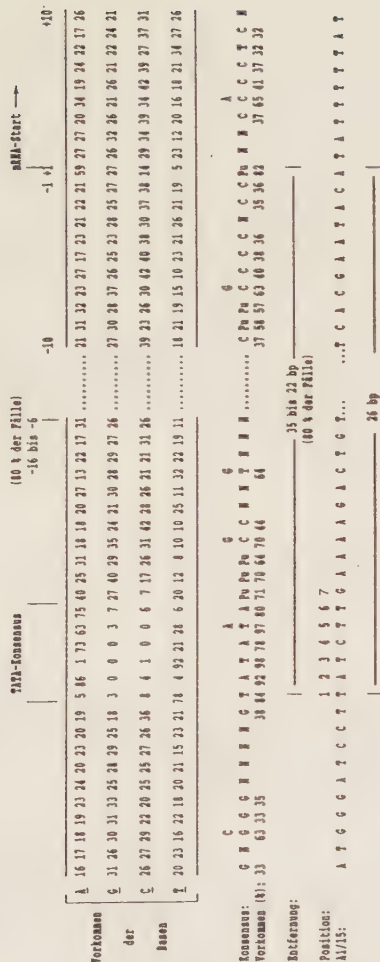
3.2.6.1 Studie eukaryotischer Promotorsequenzen

Es stellte sich die Frage, ob typische Promotorsequenzen in der 5'-Region des A1/15 vorkommen. Wie sehen solche Sequenzen aus? Von Breathnach und Chambon (69) wurde durch Kompilierung von 60 Sequenzen eukaryotischer Gene der Konsensus 5'-T-A-T-A-A/T-A-A/T-3' für die Promotor "TATA-Box" und Py-A-(Py)₄ für den mRNA-Startpunkt bestimmt (Py = Pyrimidin). Unter den 60 untersuchten Sequenzen kommen allerdings wenige humane Promotoren vor.

Um nun einen Vergleich mit A1/15 statistisch abzusichern, wurden in dieser Arbeit aus 94 zumeist humanen Genen der EMBL-Datenbank die TATA-Promotorsequenzen und mRNA-Startstellen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Der Sequenzvergleich ist im Anhang dieser Arbeit dargestellt. In den Vergleich wurden nur Promotorsequenzen von Genen mit bekanntem mRNA-Startpunkt einbezogen.

Tabelle 5(A): Berechnung einer TATA-Konsensussequenz und Vergleich mit der möglichen Al/15-Promotorsequenz. 94 menschliche Gene aus der EMBL-Datenbank, deren Promotorsequenzen und mRNA-Startpunkte bekannt waren, wurden verglichen. Die einzelnen Sequenzen sind im Anhang dieser Arbeit gegeben. Die Orientierung der Sequenzen ist 5'-3'. (Die Art der Darstellung wurde von Breathnach und Chambon (69) übernommen).

(A) Konsensussequenz von TATA-Box und mRNA-Startpunkt bei 94 Genen und Vergleich mit Al/15



(B) Häufigkeit einer bestimmten Entfernung der TATA-Box vom mRNA-Startpunkt

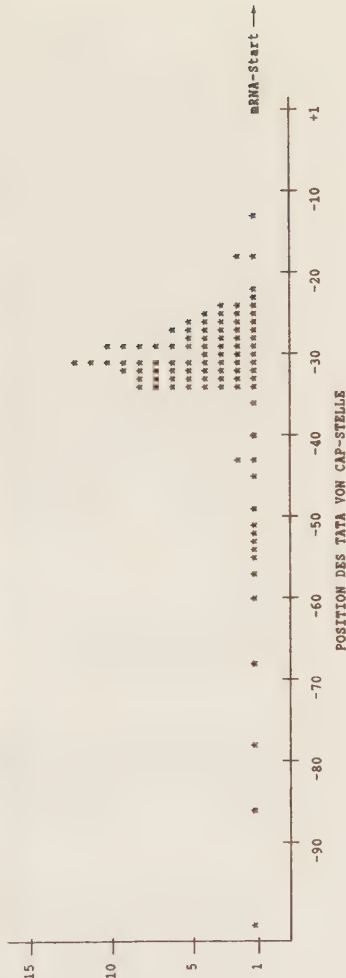


Tabelle 5(B): Graphische Darstellung der Entfernung zwischen TATA-Homologie und mRNA-Startpunkt. Jedes * entspricht einem Gen und zeigt den Abstand zwischen dem ersten T der TATA-Sequenz und dem mRNA-Start an. Für die Mehrzahl der Gene liegt dieser Punkt um -30.

Für die TATA-Box ergibt sich die Konsensussequenz 5'-T₈₄-A₉₂-T₉₈-A/T₁₀₀-A/T₉₆-A₈₀-Pu₇₁-3' (kleine Zahlen stellen %-Angaben der Häufigkeit des betreffenden Nukleotids dar; Pu = Purin) (Tabelle 5A). Die Sequenz liegt bei 80 % der untersuchten Gene zwischen -22 und -35, bezogen auf den mRNA-Startpunkt = +1 (Tabelle 5B). Daneben wurden TATA-Sequenzen im Bereich zwischen -98 und -13 identifiziert (siehe Anhang).

Der Vergleich der hier ermittelten Konsensussequenz für die "TATA"-Box mit den von Breathnach und Chambon (69) beschriebenen Daten für 60 eukaryotische Gene ergibt essentiell das gleiche Ergebnis (Tabelle 5C). Die Positionen 1, 2, 3, 5 und 6 bleiben unverändert. Die Positionen 4 und 7 sind leicht anders gewichtet. Bei Position 4 findet bei der hier berechneten Sequenz ausschließlich A oder T, bei Position 7 ergeben sich zu 71 % Purine. Diese Ergebnisse bestätigen die enorme Konservierung der TATA-Sequenz von Prokaryoten bis hinauf zum Menschen (69).

Position	5'-	1	2	3	4	5	6	7	-3'
Eukaryotische Gene		T	A	T	A	A/T	A	A/T	
Humane Gene		T	A	T	A/T	A/T	A	Pu	

Tabelle 5C: Vergleich der TATA-Konsensussequenzen eukaryotischer Promotoren (69) mit der von 94 weitgehend humanen Genen. Die genaue Position der TATA-Sequenz ist in Tabelle 5A und 5B gegeben. Pu = Purin.

Für den mRNA-Startpunkt (oder Cap-Stelle) ergeben sich häufig Purine (A/G₈₂). Die Umgebung von -10 bis +10 zeigt eine leichte Vorliebe für Cytosine, ansonsten ist keine ausgeprägte Sequenz erkennbar. In Abweichung der Regeln von Breathnach und Chambon findet sich keine deutliche Konsensussequenz Pyr-A-(Pyr)₈ für den mRNA-Startpunkt (Tabelle 5A).

Die Primer-Extensions-Experimente (siehe 3.1.5) ergeben eine 5'-NTR von A1-mRNAs von wahrscheinlich 89 Nt (siehe Abb. 9). Dies bedeutet, falls A1/15 aktiv ist, läge der mRNA-Start bei Position -89 (Numerierung ATG = +1) (siehe Abb. 13). Bei Position -118 liegt die Sequenz **TATCTT**, welche dem TATA-Konsensus ähnlich ist, mit Ausnahme des Cytosins an Position 4 (siehe Tabelle 5A,C). Diese Sequenz kommt auch, allerdings um 2 bp in 3'-Richtung verschoben, in der TATA-Box des β -Globin-Promotors (siehe Anhang) vor. Weiter in 5'-Richtung finden sich bei A1/15 Sequenzen, die der CCAAT-Box (69) ähnlich sehen. Somit kommen in 5'-Richtung der vermutlichen Cap-Stelle von A1/15 promotorähnliche Sequenzen vor.

3.2.6.2 pBC12/Seap als Reporter-Vektor

Zur Klärung der Frage, ob A1/15 transkribiert wird, wurde die putative Promotorregion vor ein Reportergen kloniert. Hierzu wurde eine modifizierte Form von humaner, placentaler Alkalischer Phosphatase (70) eingesetzt.

Normalerweise ist Alkalische Phosphatase ein membranständiges Enzym (71,72). Berger et al. (70) führten ein Stoppkodon in den C-terminalen Bereich ein, so daß die Region, die das Protein in der Membran verankert, verloren geht. Als Folge hiervon kann das Enzym von den transfektierten Zellen sekretiert und seine Aktivität bequem, schnell und ohne Einsatz radioaktiver Substanzen bestimmt werden. Der verwendete Vektor pBC12/Seap (Secreted alkaline phosphatase) ist dargestellt in Abb. 18.



Abb. 18: Skizze des pBC12/Seap-Vektors. Von der Polylinkerregion sind nur die hier verwendeten Stellen von EcoRV und HindIII dargestellt. Daran schließt sich die Seap-cDNA an. Durch ein Stoppkodon in der kodierenden Region bei Position 1530 (hier nicht dargestellt) fehlt der kodierten Alkalischen Phosphatase die Membrandomäne und das Enzym kann von den transfektierten Zellen in das Medium abgegeben werden. An die Seap-cDNA wurde der 3'-Bereich des Preproinsulins (Seap/Ins) fusioniert. Dieser erbringt ein Intron und ein effektives Polyadenylierungssignal. Das Intron beginnt bei Position 2089 (ExonGT) und endet bei 2588 (IntronAG). Das Polyadenylierungssignal ist mit Poly(A) gekennzeichnet. Zur Amplifizierung des Vektors in *E. Coli* verfügt pBC12/Seap über einen pBR322-Origin (Ori) und eine Ampicillinresistenz (AmpR) (70). Der SV40 Ori bewirkt in COS-Zellen, daß sich das Plasmid amplifiziert (73,74).

3.2.6.3 Klonierung in pBC12/Seap

Die putative Promotorregion von λ -A1/15 weist wenig nutzbare Restriktionsstellen auf (Abb. 19). Da der Startpunkt der A1-mRNA etwa 30 bp hinter der BamHI-Stelle zu liegen käme (siehe 3.1.5), wurde für den möglichen Promotor und andere Regulationselemente etwa 1.4 kb in 5'-Richtung bis zur ersten DraI-Stelle und mindestens 30 bp in 3'-Richtung der BamHI-Stelle in Erwägung gezogen. Praktisch nutzbar war die PvuII-Stelle bei Position +34 (Abb. 13,19).

Deshalb wurde die Promotorregion an der BamHI-Stelle zunächst zerlegt und das 4,5 kb EcoRI-BamHI sowie 1,3 kb BamHI-XhoI Fragment getrennt in pUC-Vektoren amplifiziert. Sodann wurde das 1,4 kb DraI-BamHI-Restriktionsfragment und 0,16 kb BamHI-PvuII mittels präparativer Gelelektrophorese isoliert. Die beiden Fragmente wurden gemischt und in die HindIII-Stelle von pUC8 kloniert. Auf diese Weise wurde die A1/15-5'-Region wieder zusammengefügt. Dieser Schritt wurde durch Sequenzierung des entstandenen Vektors und den Vergleich mit der A1/15-Sequenz, die über die BamHI-Stelle hinausgeht, kontrolliert (nicht gezeigt).

Die A1/15-Sequenz wurde dann mit SmaI und HindIII aus dem pUC herausgeschnitten und in den Polylinker des pBC12/Seap (EcoRV-HindIII) kloniert. Somit kann das Fragment nur in einer Orientierung eingebracht werden und das ATG-Kodon des A1, welches kotransferiert wurde, ist im gleichen Leseraster wie die Alkalische Phosphatase (Seap). Bei Benutzung des A1-ATGs entsteht somit ein Fusionsprotein aus den ersten zwölf Aminosäuren des A1, sieben Aminosäuren des restlichen pUC-Polylinkers und den 489 Aminosäuren der Seap. Da das A1-ATG von einer schwachen Konsensussequenz umgeben ist (siehe Diskussion), wird das A1-ATG vermutlich nur teilweise als Translationsstart benutzt. Der erhaltene Vektor wurde pBC12/Seap/A1prm genannt (Abb. 19).

3.2.6.4 Analyse transkriptionaler Aktivität

pBC12/Seap/A1prm sowie pBC12/Seap (Negativkontrolle) und pBC12/Seap/RSV (Positivkontrolle) wurden mittels Calciumphosphat-Kopräzipitation (75) in COS-Zellen eingebracht. pBC12/Seap/RSV (70,73) enthält als starken Promotor einen LTR (Long Terminal Repeat) des Rous-Sarkoma-Virus (RSV). Das Transfektions-Experiment wurde mit zwei verschiedenen Zellkonzentrationen (5×10^6 und 10^7) pro 9 cm-Zellkulturschale durchgeführt. 72 h nach Transfektion wurde auf Seap-Aktivität (siehe 6.2.4) getestet.

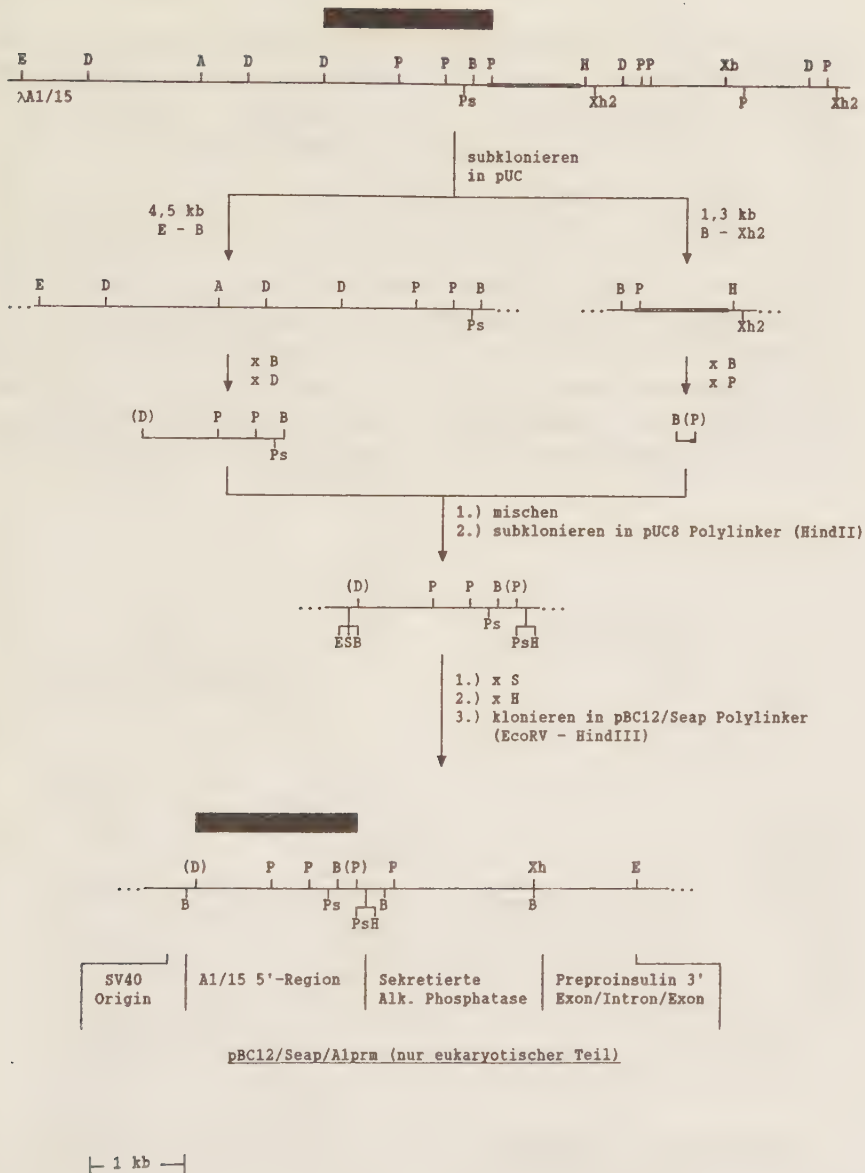


Abb. 19: Schema der Subklonierung eines putativen Promotorfragments von A1/15 in den Reportervektor pBC12/Seap. Als möglicher Träger eines Promotors wurde das DraI-PvuII Fragment, welches 1,4 Kb der Sequenz unmittelbar 5' zur kodierenden Region einschließt, ausgewählt (dicker Balken). Von pBC12/Seap ist nur der eukaryotische Teil abgebildet. Nähere Angaben siehe Text. A1 "kodierende" Region ATG TAG = ; Restriktionsstellen: A = AccI; B = BamHI; D = DraI; E = EcoRI; P = PvuII; Ps = PstI; S = SmaI; Xb = XbaI; Xh = XhoI; Xh2 = XhoII; Eingeklammerte Schnittstellen sind verlorengegangen.

Die Absorption des bei Aktivität von Alkalischer Phosphatase entstehen den p-Nitrophenolats wurde bei 405 nm gemessen und hieraus der Enzymumsatz in nmol Substrat nach Henthorn et al. (71) berechnet. Als weitere Negativkontrolle wurde Gibco-Zellkulturmedium plus Serum eingesetzt.

In Abb. 20 ist das Ergebnis dargestellt. Während die RSV-Positivkontrolle unmittelbar nach Substratzugabe reagiert, bleibt die Reaktion des Mediums von mit pBC12/Seap/Alprm transfektierten Zellen negativ und ist ununterscheidbar von den beiden Negativkontrollen. Keine Aktivität der A1/15-Sequenz ist angezeigt. Somit findet wahrscheinlich keine Transkription des A1/15-Retroposons statt. Die Reaktion des Mediums von mit pBC12/Seap/RSV transfektierten Zellen steigt mit der Zellzahl. Im Gegensatz hierzu erhöhen sich die Werte der Negativkontrollen und pBC12/Seap/Alprm nur unwesentlich.

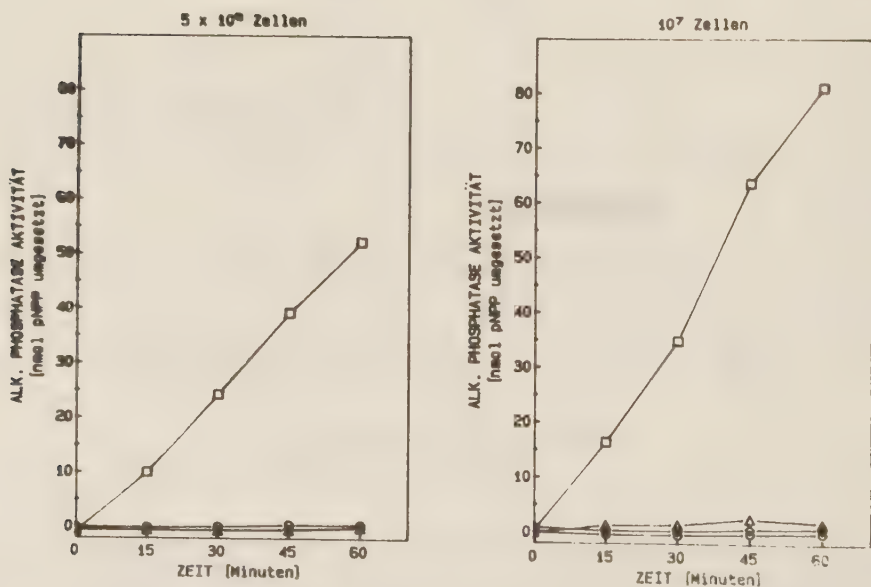


Abb. 20: Messung von Seap-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit in Zellkulturüberständen transfektierter COS-Zellen. Dreiecke: pBC12/Seap; Rauten: pBC12/Seap/Alprm; Quadrate: pBC12/Seap/RSV; Kreise: DMEM-Medium plus 15 % Serum. Der Versuch wurde durchgeführt wie in Methoden (siehe 6.2.4) beschrieben. Die Aktivität ist dargestellt als nmol Umsatz von p-Nitrophenylphosphat (pNPP).

Die neue Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann zur direkten Analyse von Genen ohne vorherige Klonierung verwendet werden (76-78). Die DNA, welche eine "Target-Sequenz" enthält, wird denaturiert. Dann werden sense- sowie antisense-Oligonukleotide anhybridisiert (Schritt 1). DNA-Polymerase synthetisiert beide Stränge der zwischen den Oligonukleotiden liegenden Targetsequenz neu (Schritt 2). Anschließend wird erneut denaturiert (Schritt 3). Die drei Schritte werden wiederholt, was zu einer Synthese-Kettenreaktion führt (Abb. 21). Die DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) überlebt hierbei auch den Denaturierungsschritt, was das Verfahren stark vereinfacht (79-91).

In dieser Arbeit wurde die PCR dazu eingesetzt, den Abstand zwischen zwei A1-Oligonukleotid-Sequenzen auf genomischer DNA zu bestimmen und auf diese Weise mögliche Intronsequenzen in genomischen A1-Klonen oder im Genom zu detektieren.

(A)

(B)

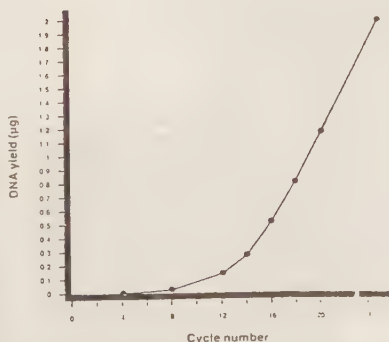
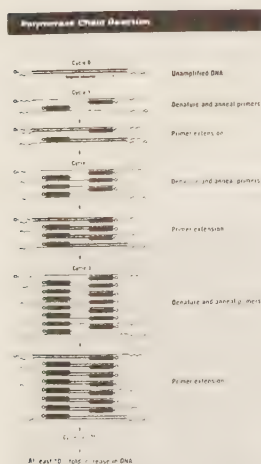


Abb. 21: (A) Schema der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sense- und antisense-Oligonukleotide werden an die denaturierte DNA hybridisiert (Schritt 1). Die Temperatur wird auf 72°C erhöht und die Targetsequenz von Taq-Polymerase in Gegenwart aller vier dNTPs neu synthetisiert (Schritt 2). Nach Denaturierung (94°C) (Schritt 3) beginnt ein neuer Zyklus durch Abkühlen auf "Annealing"-Temperatur (siehe Methoden). Die Zyklen werden 25-50 mal wiederholt. Dadurch, daß die neu synthetisierte DNA wieder amplifiziert wird, findet eine Kettenreaktion statt, an deren Ende praktisch nur noch die amplifizierte DNA vorhanden ist. (B) Zunahme der DNA-Menge mit fortschreitenden Zyklen. Die Menge steigt am Anfang exponentiell, später wird die Menge an Enzym limitierend, und die Menge an DNA steigt nur noch linear mit der Zykluszahl. Entnommen von: Perkin-Elmer (79).

Der genomische A1-Klon A1/15 enthält keine Introns und ist wahrscheinlich ein prozessiertes Pseudogen. Eine Expression von A1/15 ließ sich nicht nachweisen (siehe Seite 38). Es stellte sich die Frage, ob Introns in einem der anderen A1 α -Klone λ A1/2, λ A1/6, λ A1/19 oder λ A1/29 (siehe Abb. 10 Seite 23) vorhanden sind. Hierzu wurden die A1-Oligonukleotide A1,2s und A1,251 (Tabelle 6) mit einigen ng Phagen-DNA gemischt, denaturiert und 25 Zyklen PCR durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 22 gezeigt.

Die berechnete Länge des Syntheseproduktes von λ A1/15 mit A1,2s und A1,251 beträgt 761 bp. Intervenierende Sequenzen der anderen Klone könnten durch längere PCR-Produkte angezeigt werden. Das Experiment ergibt die erwartete Bande von etwa 760 bp bei A1/15 (Abb. 22). Die anderen λ -Klone zeigen ähnliche PCR-Produkte. λ A1/19 ergibt eine etwas kürzere Bande. Die Kontrollansätze ohne Taq-Polymerase führen zu keiner Reaktion.

Diese Ergebnisse zeigen, daß intronlose Sequenzen in den Klonen im Bereich zwischen Aminosäuren 2 und 251 des A1 (319 Aminosäuren) vorhanden sind. Somit repräsentieren diese Klone wahrscheinlich wie A1/15 intronlose Pseudogene. Introns im Bereich der letzten 68 Aminosäuren des A1 sowie in den nichttranslatierten Bereichen können bei diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden.

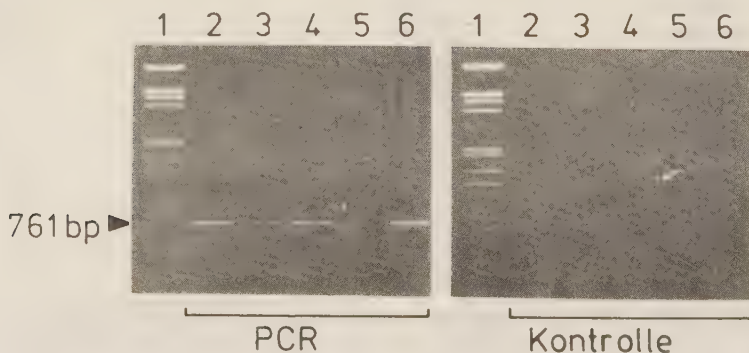


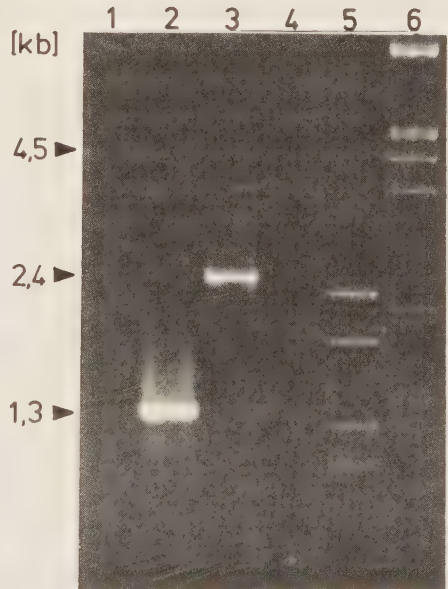
Abb. 22: PCR-Analyse der genomischen A1-Klone. Bahn 1: Molekulargewichtsmarker λ Sam7 x EcoRI x HindIII; 2: λ A1/2; 3: λ A1/6; 4: λ A1/15; 5: λ A1/19; 6: λ A1/29. Je 200 μ l Phagenlysat wurde phenol- und CHCl_3 -extrahiert, anschließend ethanolgefällt. 1/4 der DNA-Menge wurde mit je 0,3 μ mol Oligonukleotid A1,2s und A1,251, 0,1 mM dNTPs und 2,5 units Taq-Polymerase in 1 x Polymerase-Puffer gemischt (Perkin-Elmer), 10 min denaturiert bei 94°C und 25 Zyklen (2 min/37°C - 72°C/3 min - 1 min/94°C) gestartet. Als Kontrolle wurden die PCR ohne Taq-Polymerase durchgeführt. 1/10 des jeweiligen Reaktionsgemischs wurde auf einem 0,8 % Agarosegel analysiert.

3.3.2

Analyse der A1-Genstruktur in genomischer DNA

Es stellte sich die Frage, ob sich mit der PCR-Methode Introns zwischen A1-Sequenzen im humanen Genom nachweisen lassen. Die prozessierten A1-Pseudogene sollten sich alle in einem Syntheseprodukt akkumulieren, ein intronhaltiges Gen könnte sich durch längere Produkte anzeigen. Limitierend hierbei ist die begrenzte Länge der Taq-Syntheseprodukte. An reinen DNA-"Templates" ist die Ausbeute der PCR-Reaktion bei Entfernungen bis 2,4 kb gut, bei 4,5 kb findet eine drastische Reduktion der Ausbeute mit Abbruchreaktionen statt (Abb. 23). Die Kontrollreaktion (2 µg humane Placenta-DNA plus M13-Primer) zeigt, wie erwartet, keine Bande.

Abb. 23: Test der Kapazität der Taq-Polymerase an reinen Plasmid-DNAs. Die PCR-Reaktionen wurden 35 Zyklen durchgeführt mit je 0,06 µM M13-Universal- und M13-reversem "Primer" an folgenden DNAs: Bahn 1: 1 µg humane Placenta-DNA (Negativ-Kontrolle); 2: 1 ng pUC18/A1_{gen}(BX) (enthält 1,3 kb BamHI-XhoI A1/15-Fragment); 3: 1 ng pUC18/A1_{gen}(XX) (enthält 2,4 kb XhoI-XhoI Fragment von A1/15); 4: 1 ng pUB18/A1_{gen}(EB) (enthält 4,5 kb EcoRI-BamHI Fragment von A1/15); 5: Molekulargewichtsmarker pBR328 x BglI plus pBR328 x HinfI; erkennbar sind nur die Banden bei 2176 bp, 1766 bp, 1230 bp, 1033 bp und 653 bp; 6: Molekulargewichtsmarker λSam7 x EcoRI x HindIII.

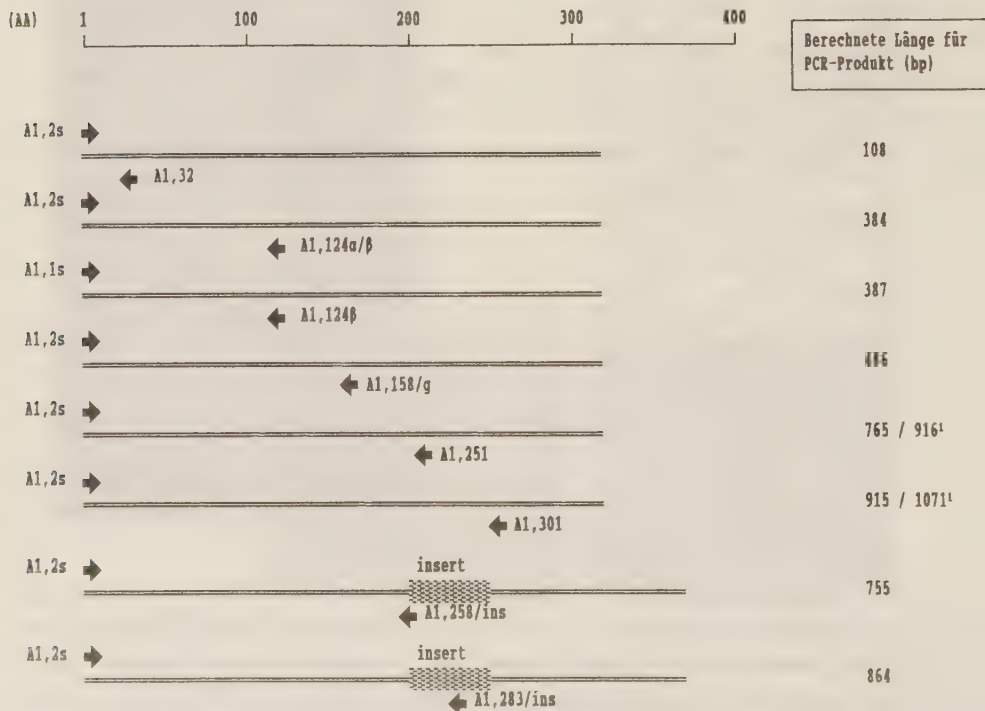


Bei Targetsequenzen in genomischer DNA verringert sich die Länge der Syntheseprodukte auf maximal 2 kb (81). Zur Analyse der Struktur der A1-Gene wurden deshalb mehrere Kombinationen von Oligonukleotiden verwendet sowie Oligonukleotide von verschiedenen A1-cDNAs (siehe 3.1.3) (Abb. 24). Da keine Sequenz einer humanen A1 β -mRNA im Bereich der Aminosäuren 1-44 des Proteins A1 bekannt ist (siehe Abb. 6,7), war nicht klar, ob A1,2s komplementär zu der genomischen A1 β -Sequenz ist. Deshalb wurden zwei sense-Oligonukleotide (A1,1s und A1,2s) mit A1,124 β zur PCR eingesetzt.

Oligo-nukleotid	Position auf A1-mRNA ¹⁾	Sequenz (5' - 3')	Beschreibung
A1,1s	1-4	TCTAAGTCAGAGTCT	sense, A1a
A1,2s	2-7	AAGTCAGAGTCTCCTAA	sense, A1a
A1,158	158-163	ATGACAATCTTATCCAC	antisense, enthält nicht die A1/15-Mutation wie A1,158g
A1,251	251-255	ACCTCCAAAATTGCT	antisense, α/β -unspezifisch
A1,283/ins	283-288	TAGCTGTTCATAGCTGCC	bindet in der Mitte der Insertsequenz von A1(ins)

¹⁾ Position in Aminosäuren auf Protein A1 ohne Met 1;

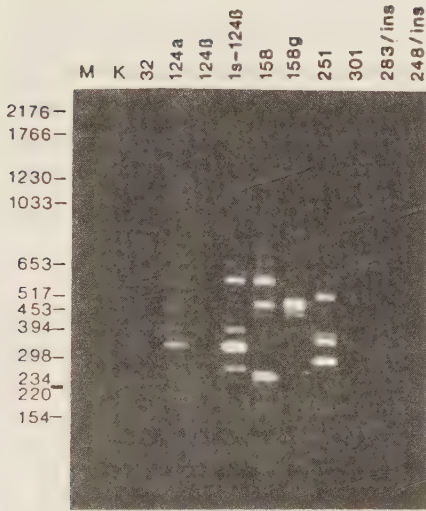
Tabelle 6: Zur PCR-Reaktion eingesetzte Oligonukleotidprimer. Die anderen hier verwendeten Oligonukleotide wurden bereits beschrieben; A1,2 und A1,32: Tabelle 4 (Seite 21); A1,124 α , A1,124 β , A1,301, A1,ins/248, A1,158g: Tabelle 3 (Seite 19).



¹⁾ berechnet für A1(ins)-Sequenz

Abb. 24: Schema der zur PCR-Analyse eingesetzten Oligonukleotide in 5' - 3' Richtung. Die Entfernung der einzelnen Sequenzen ist angegeben in Aminosäuren (AA) des Proteins A1 oder A1(ins) sowie als Länge des PCR-Produkts. A1,124 α/β = A1,124 α oder A1,124 β ; ebenso A1,158/g = A1,158 oder A1,158g. Da A1,251 und A1,301 bereits hinter dem Punkt der Insertion liegen, sind zwei PCR-Produkte möglich. In der Graphik ist nur die Situation ohne Insertion gezeichnet.

A



B

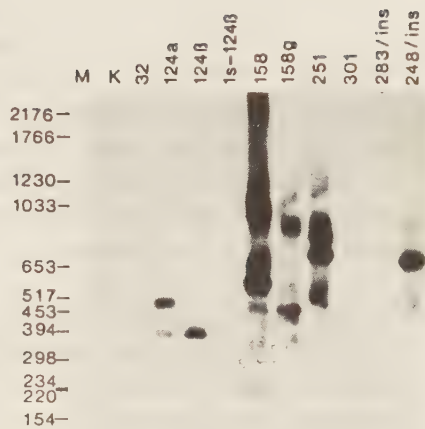


Abb. 25: Analyse der Genstruktur des hnRNP-Proteins A1 in humaner genomischer DNA mit PCR. 35 Zyklen wurden mit humaner Placenta-DNA (2 µg) und A1-sense- und antisense-Oligonukleotiden durchgeführt, wie in Abb.24 schematisch dargestellt. PCR-Schema: 2 min/42°C (35°C für A1,124a und A1,251) - 4 min/72°C - 1 min/94°C (der Denaturierungsschritt wurde nur 34 mal durchgeführt).

(A) Ethidiumbromid-gefärbte PCR-Produkte. Die DNAs wurden ethanolgefällt, und auf einem 0,8 % Agarosegel analysiert. Über den Gelbahnen sind die jeweiligen antisense-Oligonukleotide angegeben. Als sense-Oligonukleotid wurde A1,2s eingesetzt, mit Ausnahme der PCR 1s-124b (1s-124b), wo A1,1s eingesetzt wurde. M: Molekulargewichtsmarker pBR328 x BglI plus pBR328 x HinfI; K: 2 µg humane Placenta-DNA ohne PCR (Negativkontrolle).

(B) Southern-Analyse der PCR-Produkte von (A) mit A1α-cDNA (Autoradiographie: 2 h/-70°C mit Verstärkerfolie). Die Signale bleiben auch beim Waschen mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 68°C stabil (nicht gezeigt).

PCR	berechnet	experimentell	Hauptbanden
2s-32	108	keine Banden	-
2s-124a	384	180 / 220 / 330 / 380 / 520	330
2s-124b	384	130 / 380	-
1s-124b	387	270 / 330 / 380 / 600 / 2000	330
2s-158	486	140 / 170 / 240 / 330 / 360 440 / 490 / 600 / 760	240 / 600
2s-158g	486	440 / 490	490
2s-248/ins	755	750	-
2s-283/ins	864	keine Banden	-
2s-251	765	170 / 300 / 350 / 375 / 530 / 760	300 / 375 / 530
	918		
2s-301	915	keine Banden	-
	1071		

Tabelle 7: Auswertung des Ethidiumbromid-Gels von Figur 25A. Dargestellt sind die PCR-Produkte der Reaktion mit zwei Oligonukleotiden. Der berechnete Abstand zwischen den Oligonukleotiden entspricht dem der A1α-cDNA. Im Fall der PCR mit A1/ins-Oligonukleotiden wurde angenommen, daß die A1(ins)-mRNA sich von A1α nur durch die 156 bp-Insertion unterscheidet.

Das PCR-Experiment von genomischer DNA mit A1-Oligonukleotiden ist dargestellt in Abb. 25. Es ergeben sich multiple Banden bei den PCRs mit 124a, 158, 158g, 251 (Bezeichnung "A1," der Oligonukleotide weggelassen). Die intronlosen Produkte der A1-Pseudogene sind, wie erwartet, vorhanden in der berechneten Länge mit Ausnahme von 32, 301 und 283/ins. Die PCR 2s-248/ins zeigt eine dünne Bande bei etwa 750 bp, was mit der berechneten Länge von 755 bp gut übereinstimmt.

Die meisten Syntheseprodukte sind allerdings kürzer als die für kontinuierliche A1-Pseudogene berechnete Länge. Daneben fällt auf, daß die kürzeren Banden intensiv im Ethidiumbromidbild erscheinen, wohingegen die erwarteten Pseudogenbanden oft recht dünn ausfallen. Das stärkste Pseudogen-signal von 490 bp zeigt die PCR 2s-158g, begleitet von einer etwa 50 bp kleineren Bande. Beide finden sich auch bei 2s-158 wieder.

Das Bild ändert sich nach dem Transfer der DNA vom Gel auf Nylonmembran und Hybridisierung mit A1 α -cDNA (Abb. 25B und Tabelle 8). Es zeigt sich, daß die meisten der Ethidiumbromidbanden, die kürzer sind als berechnet, nicht, oder nur schwach mit der cDNA hybridisieren. Stattdessen hybridisieren die längeren Banden, d. h. größer oder gleich der berechneten Länge. Bei PCR 2s-124a und 2s-124b zeigt sich das erwartete Syntheseprodukt von 380 bp; bei 2s-124a interessanterweise zusätzlich eine Bande bei 540 bp, d. h. 160 bp länger als für intronlose Pseudogene berechnet. Dies läßt schließen auf genomische A1-Sequenzen, die im Bereich zwischen Aminosäure 2 und 124 eine Insertion aufweisen. Bei PCR 2s-124b findet sich dagegen nur die erwartete Bande bei 384 bp.

Die Reaktionen 2s-32 und 2s-301 zeigen auch nach Hybridisierung keine A1-Syntheseprodukte an. Bei 1s-124b wird bei längerer Belichtung die erwartete Bande bei 380 bp erkennbar (nicht gezeigt).

Die größten Insertionen von bis zu 520 bp zeigen sich bei der PCR 2s-158 in einem etwa 1 kb großen Syntheseprodukt. Daneben erscheinen mit hoher Intensität zwei weitere Signale bei 600 und 650 bp. Verglichen mit dem berechneten PCR-Produkt von A1-Pseudogenen sind diese Banden 120 bp und 170 bp größer als erwartet. Die Insertion von 170 bp könnte somit der 160 bp-Inserierung der PCR 2s-124a entsprechen.

Die PCR mit dem Oligonukleotid A1,158g, welches sich nur in einer Base von A1,158 unterscheidet, ergibt ein anderes Muster. Die erwartete Bande bei etwa 490 bp hybridisiert nur schwach. Das stärkste Signal der PCR 2s-158g liegt bei 950 bp und entspricht einer Insertion von 360 bp in die A1-Sequenz. Unklar ist, warum die im Ethidiumbromidbild starke Bande bei 480 bp (Abb. 25A), welche die berechnete Länge aufweist, nur schwach mit der A1-cDNA hybridisiert. Eine mögliche Erklärung wäre, daß ein unspezifisches Amplifizierungsprodukt die A1-Sequenz überlagert.

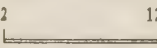
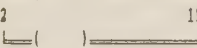
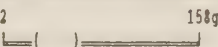
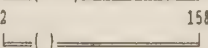
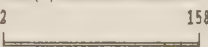
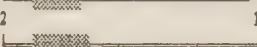
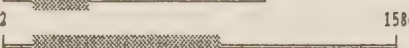
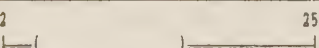
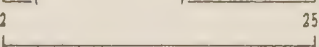
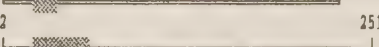
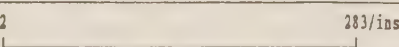
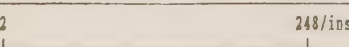
Die PCR 2s-251 zeigt eine stark hybridisierende Bande der erwarteten Länge. Daneben findet sich noch ein starkes Signal bei etwa 830 bp und ein schwächeres bei 900 bp, was Insertionen von 70 und 140 bp entsprechen würde.

Die Verwendung des Oligonukleotids A1,248/ins spezifisch für die A1(ins)-cDNA ergibt eine deutliche Bande der berechneten Größe bei 750 bp. Ein Signal der erwarteten Größe von 850 bp wurde ebenso bei 2s-283/ins bei längerer Belichtung sichtbar (nicht gezeigt). Keine Insertionen sind hier erkennbar.

Eine Verlängerung der Autoradiographie von Abb. 25B auf 3 Tage ergibt zahlreiche schwach hybridisierende Banden sowohl kleiner als auch größer den berechneten Banden in fast allen Ansätzen. Diese entstehen vermutlich in meisten Fällen durch unspezifische Hybridisierung während des "Annealing"-Schritts der PCR (nicht gezeigt).

Es stellte sich die Frage, ob das PCR-Muster auch bei einer leichten Abwandlung der experimentellen Bedingungen reproduzierbar ist. Weiterhin wäre es wünschenswert, die Anzahl der offensichtlich unspezifischen Produkte (siehe Abb. 25A) zu verringern. Hierzu wurde als wesentlicher Parameter die Reaktionszeit von 4 min des Experimentes in Abb. 25 auf 3 min reduziert. Weiterhin wurde die "Annealing"-Temperatur auf 37°C festgesetzt. Das Experiment ist in Abb. 26 dargestellt.

Bei PCR 1s-124a ergibt sich eine Hauptbande bei 380 bp, die dem cDNA-Abstand der Oligonukleotidsequenzen entspricht sowie das Signal bei 540 bp (weißer Pfeil, Bahn 2). Beide Banden finden sich auch in Abb. 25A/B (PCR 2s-124a) unter anderen experimentellen Bedingungen. Somit ist das PCR-Muster

Fragment	Bande	Insertion / Deletion		Intensität
2 	380	-	-	++
2 	540	160	-	++
2 	380	-	-	++
1 	380	-	-	+ ¹⁾
2 	320	-	160	+
2 	370	-	110	+
2 	480	-	-	++
2 	600	120	-	+++
2 	650	170	-	+++
2 	1000	520	-	+++
2 	380	-	110	++
2 	460	-	20	+
2 	490	-	-	++
2 	600	110	-	+
2 	650	160	-	+
2 	950	360	-	+++
2 	380	-	380	+
2 	760	-	-	+++
2 	830	70	-	+++
2 	900	240	-	+++
2 	870	-	-	+ ¹⁾
2 	750	-	-	+++

¹⁾ Nur bei längerer Belichtung sichtbar.

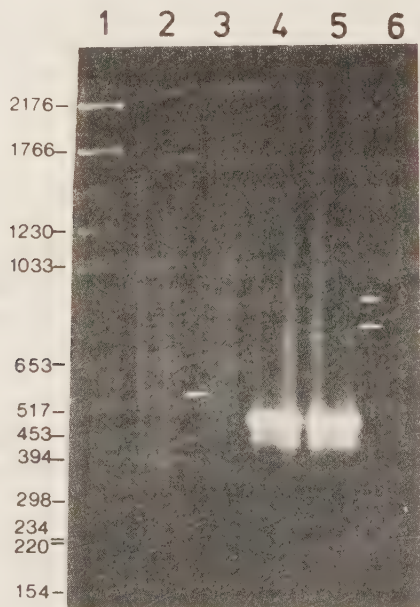
0 200 400 600 800 1000 (bp)

Tabelle 8: Auswertung der Hybridisierung von PCR-Syntheseprodukten mit Al α -cDNA (Abb. 25B). Die vermutete Struktur der Syntheseprodukte ist graphisch dargestellt. Deletion: (); Insertion: ; (verglichen mit der Al-cDNA ). Intensitäten der Banden: + schwach; ++ mittel; +++ stark. Autoradiographie: 2 h/-70°C mit Verstärkerfolie.

für diese beiden Signale reproduzierbar, nicht dagegen für die Bande der PCR 2s-124a bei 330 bp (Abb. 25A), die keine A1-Sequenz außer den Oligonukleotiden enthält (Abb. 25B). Die Verwendung von A1,124 β als anti-sense-Oligonukleotid ergibt nur die Pseudogenbande wie bei Abb. 25.

Die PCR mit A1,158 und A1,158g zeigen viel einfachere Muster, verglichen mit Abb. 25. So findet sich bei 490 bp eine starke Bande, die der erwarteten Pseudogenbande entspricht sowie eine etwa 50 bp kürzere Bande. Bei beiden Reaktionen ist das Muster identisch im Gegensatz zu Abb. 25A. Dies liegt vermutlich darin begründet, daß die Hybridisierungstemperatur für diese Oligonukleotide hier von 42°C auf 37°C abgesenkt wurde. Dotblot-Analysen ergaben, daß diese Temperatur nicht stringent genug ist, um zwischen beiden Sequenzen ausreichend zu diskriminieren (nicht gezeigt). Daneben zeigen sich dünnere Banden bei etwa 700 und 800 bp, welche sich nicht in Abb. 25 wiederfinden und daher vermutlich unspezifisch sind (weiße Pfeile, Bahn 4/5).

Die PCR durchgeführt mit M13-Oligonukleotiden ergibt wie erwartet keine Signale mit humaner DNA.



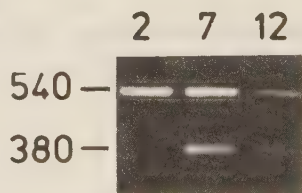
Figur 26: PCR-Analyse von A1-Genstrukturen mit 3 min Synthesezeit. Je 2 μ g humane Placenta-DNA wurden mit A1-Oligonukleotiden gemischt und 35 PCR-Zyklen (37°C/2 min - 72°C/3 min - 94°C/1 min) durchgeführt. Bahn 1: Molekulargewichtsmarker pBR328 x BglII plus pBR328 x HinfI. Bahn 2: PCR 1s-124 α ; Bahn 3: PCR 1s-124 β ; Bahn 4: PCR 1s-158; Bahn 5: PCR 1s-158g; Bahn 6: PCR M13-Universalprimer-M13-reverser Primer; (Negativkontrolle). Der weiße Pfeil bei Bahn 2 markiert das spezifische PCR-Produkt bei 540 bp. Die beiden Pfeile bei Bahn 5 zeigen dagegen vermutlich unspezifische Produkte an.

3.3.3 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Frage, die sich nun stellte, betraf die Sequenz der PCR-Produkte, insbesondere die Natur der Insertionen. Als Modell hierfür wurden die beiden Syntheseprodukte der PCR 2s-124a gewählt. Es wurde erwartet, daß die 380 bp-Bande die lineare Pseudogensequenz, und die Bande bei 540 bp A1-Sequenzen einschließlich einer Insertion von 160 bp enthält.

Hierzu wurde die Bande bei 540 bp mittels präparativer Gelelektrophorese isoliert und ein Aliquot reamplifiziert mit Taq-Polymerase. Es zeigt sich, daß nur zwei Produkte entstehen, einmal die 540 bp-Bande und die Pseudogenbande von 380 bp (Abb. 27). Beide Banden wurden ausgeschnitten und eluiert.

Abb. 27: Reamplifizierung des 540 bp-Produkt der PCR 2s-124a. Die Länge der Produkte ist angezeigt in bp. Die PCR 2s-124a wurde durchgeführt und der Bereich um 540 bp ausgeschnitten. Das Verhältnis der beiden neusynthetisierten Produkte war abhängig von der Mg^{2+} -Konzentration. Bei 2 mM Mg^{2+} wurde die größere Bande im Überschuß produziert, bei 7 mM Mg^{2+} lag das Verhältnis bei etwa 1:1, während bei 12 mM die Effizienz der Gesamtreaktion sank.



Es zeigte sich, daß die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte (siehe Methoden) zahlreiche Schwierigkeiten aufwies. Hierzu zählten Kontaminationen mit Oligonukleotiden sowie Sekundärstrukturen und Abbaureaktionen. So konnte von beiden Fragmenten nur partielle Sequenzen erhalten werden. Die Sequenzierung des 380 bp PCR 2s-124a (PCR-A) Fragmentes ergibt eine A1-Sequenz (Abb. 28).

PCR-A	100	XACXAGGTGGXTGGXAGAGTTGTGGXACXAAAGAGAGCTGTCTCXAGAGAAGATTCTCAA	42
A1a	228	CACAAGGTGGATGGAAGAGTTGTGGAACCAAAGAGAGCTGTCTCCAGAGAAGATTCTCAA	287
PCR-A	41	AGACCAGGTGCCXACTTAACTGTGAAAAAGATATTTGTTGG	1
A1a	288	AGACCAGGTGCCCACTTAACTGTGAAAAAGATATTTGTTGG	329

Abb. 28: Sequenz des PCR-A-Fragments (partiell). Gezeigt sind 100 bp des L-Stranges des PCR 2s-124a Syntheseproduktes (PCR-A; 380 bp) im Vergleich mit A1a (Numerierung ATG = +1). Die PCR-A-Sequenz wurde durch direkte Sequenzierung mit A1,124a erhalten und besitzt unsichere Positionen (mit X gekennzeichnet). Über die hier dargestellte Sequenz konnte nicht mehr mit ausreichender Präzision gelesen werden (nicht gezeigt).

Aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten wurde das Syntheseprodukt der PCR 2s-124a von etwa 540 bp (PCR-B-Fragment) in M13mp18 kloniert und die vollständige Sequenz bestimmt. Es zeigte sich, daß das PCR-B-Fragment außer den Oligonukleotidsequenzen keine A1-Sequenz enthält. Dieser Punkt wird in der Diskussion ausführlich behandelt.

3.3.4 Analyse der A2-Genstruktur

In Zusammenarbeit mit T. Kozu (z. Z. Saitama Cancer Research Institute, Komuro, Japan) wurde die Genstruktur des zweiten Haupt-hnRNP-Proteins, des A2 mit PCR untersucht (Abb. 29). Im Gegensatz zu dem hnRNP-Protein A1, das durch eine Multigenfamilie kodiert wird, läßt genomische Southern-Analyse darauf schließen, daß wahrscheinlich nur ein A2-Gen (92,93) im menschlichen Genom existiert. Durch die Etablierung einer nahezu vollständigen A2 cDNA (93) stand genügend DNA-Sequenz zur Verfügung, um Oligonukleotide zu synthetisieren. Das berechnete PCR-Produkt der cDNA mit den Oligonukleotiden A2,992s und A2,1641 besitzt eine Länge von 667 bp.

Die Polymerase-Kettenreaktion, durchgeführt mit humaner Placenta-DNA und A2,992s sowie A2,1641, ergibt das berechnete Produkt neben einer Bande bei 230 bp. Die Hybridisierung mit A2-cDNA zeigt, daß die 670 bp Bande sehr

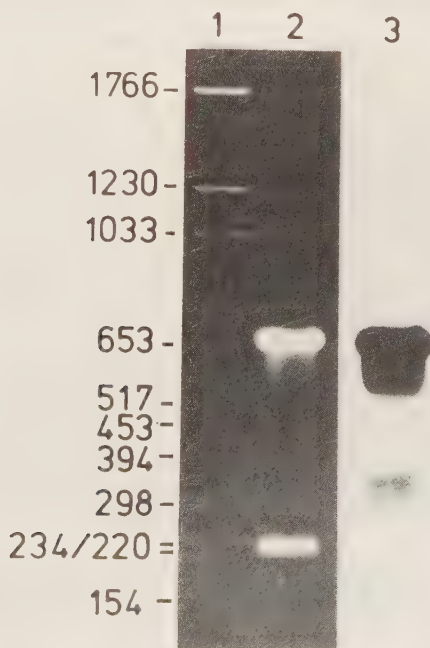


Abb. 29: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt an humaner Placenta-DNA mit A2-Oligonukleotiden. Die Bedingungen sind identisch mit denen von Abb. 26. Bahn 1: Molekulargewichtsmarker pBR328 x BglI plus pBR328 x HinfI; 2: PCR A2,992s-A2,1641; 3: Southern-Analyse der DNA von Bahn 2 mit A2-cDNA. Autoradiographie: 2 h /-70°C mit einer Verstärkerfolie.

stark reagiert (Spur 3). Daneben fand sich noch ein blasses Signal bei etwa 350 bp. Die intensive Bande bei 230 bp hybridisiert dagegen nicht mit A2-cDNA.

Das 700 bp-Fragment wurde reamplifiziert, mit präparativer Gelelektrophorese isoliert und teilweise sequenziert. Wie erwartet ergab sich die Sequenz des 3'-NTRs der A2 cDNA (nicht gezeigt). Somit weist die PCR-Analyse darauf hin, daß das A2-Gen keine Introns im 3'-NTR besitzt. Der endgültige Beweis hierfür kann nur durch Klonierung und Sequenzierung des Gens erbracht werden.

3.4 Experimente mit antisense-A1-Oligonukleotiden

Die Funktion des hnRNP-Proteins A1 ist unklar. Ist das Protein A1 essentiell für die Zelle, oder kann sie auf die Gegenwart von A1 in hnRNP-Komplexen verzichten? Seit langem ist bekannt, daß die Menge des Proteins A1 in der hnRNP-Struktur in ruhenden Zellen stark reduziert ist. Allerdings findet sich auch in ruhenden Zellen noch etwas A1 (43-47) (Abb. 2).

Anti-sense Oligonukleotide haben sich als wertvolles Werkzeug zum Studium von Genexpression durch selektive Inhibierung der Translation von mRNAs erwiesen (94-108). In dieser Arbeit wurde versucht, mit A1-antisense-Oligonukleotiden A1-mRNAs in HeLa-Zellen selektiv zu inhibieren.

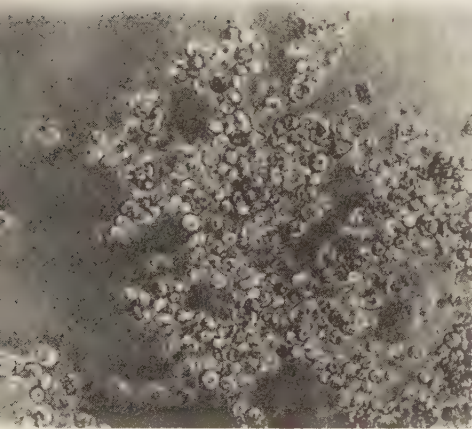
HeLa-Zellen wurden in Mikrotiterplatten angesiedelt, und nach 16 h für die Experimente verwendet (siehe Methoden). A1-antisense Oligonukleotide wurden dann in einer Konzentration von 10-12 μ M zu den Zellen gefügt. Nach 24 h wurden die Zellen im Phasenkontrast-Mikroskop untersucht (Abb. 30).

Es zeigt sich, daß das Oligonukleotid A1,32 (siehe Tabelle 4, Seite 18) HeLa-Zellen zum Absterben bringt. Morphologisch tote Zellen sind bereits nach 8 h erkennbar (nicht gezeigt), der Effekt nimmt mit der Zeit zu. Nach 24 h finden sich zahlreiche tote Zellen, ebenso bei Behandlung mit A1,124 α . Der Effekt beruht nicht auf einer allgemeinen toxischen Wirkung der Oligonukleotide, da das A1,124 β -Oligonukleotid kaum Wirkung auf die HeLa-Zellen zeigt (Abb. 30).

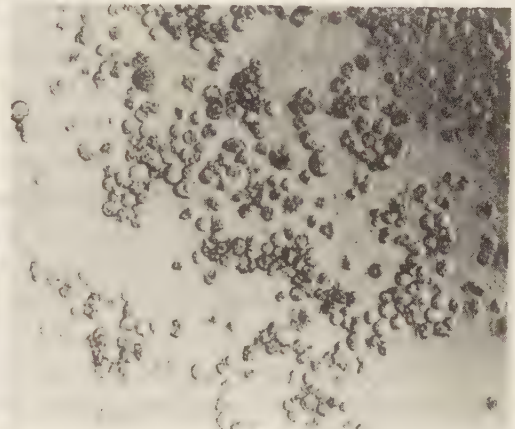
Die A1,32-Sequenz wurde von der Aminosäuresequenz des A1 abgeleitet, und stellt ein Gemisch aus 32 DNA-Sequenzen dar (siehe Tabelle 4). Es kann

an alle A1-mRNAs binden, die diese Aminosäuren kodieren. Die A1 α -mRNA wird relativ stark exprimiert, im Gegensatz zur A1 β -mRNA, die in HeLa-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 11). Der Effekt der antisense Oligonukleotide korreliert somit mit der Häufigkeit der A1-mRNAs in vivo.

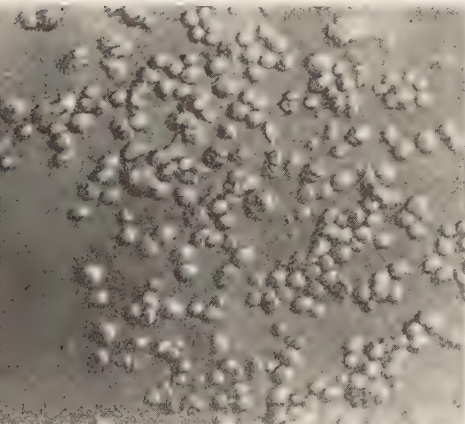
A1,32



A1,124 α



A1,124 β



Kontrolle



Abb. 30: Experimente mit A1-antisense-Oligonukleotiden A1,32; A1,124 α und A1,124 β . Die Kontrollzellen erhielten keine DNA. Die Endkonzentration an Oligonukleotid betrug 10-12 μ M. Die Zellen wurden nach 24 h im Phasenkontrast-Mikroskop (ZEISS IM) bei 125facher Vergrößerung untersucht.

HnRNP-Proteine sind konservierte Kernproteine, die an hnRNA noch während der Transkription binden. Sie gehören zu den häufigsten Kernproteinen; die Menge beträgt bei logarithmisch wachsenden HeLa-Zellen etwa 30 % des Anteils an Histonen. Zahlreiche Ergebnisse weisen darauf hin, daß diese Proteine die Aufgabe der Verpackung der hnRNA und somit wahrscheinlich die Etablierung einer für das Spleißen geeigneten räumlichen Konfiguration übernehmen (5-7,21). In Übereinstimmung hiermit inhibieren monoklonale oder polyklonale Antikörper spezifisch für hnRNP-Proteine das Spleißen von pre-mRNA in vitro (36,37). Das A1 (32 kDa) nimmt unter dieser Gruppe von Proteinen eine Sonderstellung ein, da seine Expression an das Zellwachstum geknüpft ist (43-47). Das Studium des hnRNP-Proteins A1 kann somit zum grundsätzlichen Verständnis des Ablaufs der hnRNA-Prozessierung und seiner Regulation beitragen.

A1 α -cDNA

In dieser Arbeit wurden neue humane A1-cDNAs charakterisiert. Die Sequenzanalyse ergab, daß außer dem bis dahin bekannten A1-cDNA-Klon pRP10 (39) noch wenigstens zwei weitere Klassen von A1-cDNAs existieren. Aufgrund von Restriktions- und Sequenzdaten wurde die A1 α -Gruppe typisiert. Hierzu gehören pRP10, A1 α , A1 α (0,7) und die vor kurzem veröffentlichte A1-cDNA pRP15 (57). Alle cDNAs, außer den hier beschriebenen, wurden aus verschiedenen cDNA-Banken isoliert. Keine der Sequenzen ist identisch mit einer anderen. Die Unterschiede in den einzelnen Nukleotidsequenzen sind nur minimal. Wenn man ausschließt, daß die beobachteten Unterschiede in der Nukleotidsequenz auf Synthesefehler bei der cDNA-Präparation beruhen, ist es wahrscheinlich, daß die A1 α -cDNAs von einem korrespondierendem A1-Gen stammen. Somit würden die beobachteten Unterschiede individuelle Polymorphismen darstellen.

Die abgeleitete A1-Aminosäuresequenz entspricht exakt der hergeleiteten Sequenz des hnRNP-Proteins A1 aus der Ratte (42). Die Aminosäuren 2 (Ser) bis 195 (Arg) sind ferner identisch mit der A1/UP1-Sequenz aus Kalbsthymus (siehe Einleitung) (56). Somit wurde das Protein A1 seit der Divergenz der Säuger von 80 Millionen Jahren ebenso konserviert wie die Histone H3 und H4, α -Actin und Somatostatin 28 (109). Anzumerken ist, daß wie bei den Histonen auch Isoformen des Proteins existieren (Seite 58).

Die Northern-Analyse von HeLa-poly(A⁺)-RNA mit α -spezifischem Oligonukleotid A1,124 α unter stringenten Bedingungen zeigt, daß der α -Typ unter den A1-mRNAs wahrscheinlich vorherrschend ist. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß A1,124 α mehr als einen Typ von A1-mRNA erkennen kann (zum Beispiel mRNAs mit einer A1/15-Mutation) (siehe Seite 30).

A1 β -cDNA

Ein zweiter Typ von A1-mRNA wird durch die A1 β -cDNA repräsentiert. Die Nukleotidsequenz der kodierenden Regionen sind beide etwa 6 % verschieden von der A1 α -Sequenz. Deshalb müssen in der Hepatoma-Zelllinie Li-7, aus der die cDNA-Bibliothek präpariert worden war (110), zwei verschiedene A1-Gene aktiv gewesen sein. Alle Nukleotidwechsel in der kodierenden Region sind "stille" Mutationen, das heißt keine Aminosäure des A1 ist verändert, soweit die Sequenzen vergleichbar sind. Da die A1 β -cDNA wahrscheinlich kein vollständiges 5'-Ende enthält, können Abweichungen in diesem Bereich aber nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu A1 α zeigt die Northern-Analyse von poly(A⁺)-RNA aus HeLa-Zellen mit einem A1 β -spezifischen Oligonukleotid keine Signale. Somit wäre es denkbar, daß eine gewebespezifische Expression vorliegt, oder die A1 β -mRNA eine Hepatom-spezifische mRNA darstellt.

Isoformen von mRNAs, die sich nur durch stille Mutationen unterscheiden, scheinen selten zu sein. So wurden bislang bei zahlreichen Proteinen mRNA-Isoformen gefunden, die sich aber alle auch in der Peptidsequenz auswirkten (siehe z. B. Referenzen 111-114). Ein Beispiel für Divergenz der Nukleotidsequenz mit identischer Aminosäureabfolge des Proteins stellen Calmodulin-mRNAs dar (115,116). Eine Suche nach weiteren Beispielen in der EMBL-oder Genbank-Datenbank blieb erfolglos.

Die A1 β -cDNA ist der von Cobianchi und Mitarbeitern (54) veröffentlichten HDP-182-Sequenz aus der Ratte ähnlicher als der Nukleotidsequenz der humanen A1 α -cDNA (oder pRP10/15). Somit stellt das Gen, von dem die HDP-182 mRNA transkribiert wurde, kein ausschließliches Ratten-A1-Gen dar, sondern hat ein Homolog auch im humanen Genom.

Kimura (117) beschrieb als Wert für die natürliche Mutagenese der dritten Position des Kodons in einer funktionalen Polypeptidkette $3,7 \times 10^{-9}$ /Stelle/Jahr. Legt man diesen Wert zugrunde, so ergibt sich, daß die Gene für A1 α und A1 β vor etwa 20 Millionen Jahren divergierten. Zu berücksichtigen ist hier, daß die Mutagenese neutraler Positionen in verschiedenen Genen unterschiedlich sein kann (118).

Das erste ATG-Kodon der bekannten A1-cDNAs steht im Kontext GCC GTC ATG TCT. Dies stimmt mit der optimalen Konsensussequenz für Translationsstart GCC A/GCC ATG G (119) darin überein, daß GCC an den Positionen -6 bis -4 (ATG = +1) und ein Guanodin an der Position -3 steht. Das für eine maximale Translationseffizienz wichtige Guanodin an Position +4 findet sich nicht wieder. Man könnte somit vermuten, daß die A1-mRNAs ineffizient translatiert werden. Dies steht in starkem Gegensatz zu der Häufigkeit des Proteins A1 im Zellkern (21) und kann nur durch die hohe Konzentration der A1-mRNA im Cytoplasma erklärt werden (57). Im Gegensatz hierzu besitzt eine das hnRNP-Protein C1 kodierende cDNA das ATG in einer effizienteren Konsensussequenz mit Guanodin bei Position +4 (41).

Differentielle Polyadenylierung

Die A1-cDNAs unterscheiden sich in der differentiellen Benutzung von Polyadenylierungssignalen. Bei A1 α ist nicht klar, welches Signal benutzt wurde, da die Sequenz zu früh terminiert. Die pRP10 entsprechende mRNA benutzte das erste AATAAA-Signal bei Position +1440 (siehe Abb. 6/7) (39), während A1 α (0,7), A1 β , A1(ins) und pRP15 (57) das zweite Signal bei + 1830 verwandten. Ähnliches wurde bei der cDNA für das hnRNP-Protein C1 gefunden (41).

A1(ins)-cDNA

Der dritte Typ von A1-mRNA wird durch die A1(ins)-cDNA repräsentiert. Wie im Ergebnisteil beschrieben, sind 156 bp zusätzlich in den C-terminalen Bereich der A1-kodierenden Region der A1 α -Sequenz inseriert (Abb. 6/7). Weder das A1-Leseraster, noch die Domänenstruktur des resultierenden Proteins wird hierdurch unterbrochen. Die Nukleotidsequenz der A1(ins)-cDNA scheint unvollständig bezüglich des 5'-Endes zu sein, somit könnten in

diesem Bereich Änderungen der Aminosäuresequenz kodiert sein.

Einige Ergebnisse lassen aber vermuten, daß die A1(ins)-mRNA sich von der A1-mRNA nur durch die Insertion unterscheidet. So ist die verbleibende Nukleotidsequenz identisch mit der A1 α -Sequenz. Der fast vollständige A1-cDNA-Klon pRP15 (57) unterscheidet sich von A1(ins) außer durch die fehlende Insertion und einem längeren 5'-Ende nur durch zwei Punktmutationen, nämlich GGC $\rightarrow$ GGT (Position +744) und die Deletion eines Thymidins im T-Kluster des 3'-NTRs um Position +1310. Darum ist schwer vorstellbar, daß die 5'-fehlende A1(ins)-Sequenz stark von A1 α abweicht.

Weiterhin ergab die Northern-Analyse mit dem A1(ins)-spezifischen Oligonukleotid A1,248/ins (siehe Abb. 8) zwei Banden bei etwa 1,7 und 2,0 kb, was der Länge der A1-mRNAs (1,5 und 1,8 kb) plus 156 bp Insertsequenz gut entspricht. In Übereinstimmung hiermit zeigte die PCR-Analyse von humaner DNA mit A1,2s und A1,284/ins ein Signal, dessen Länge dem Abstand der Sequenzen auf einer A1(ins)-mRNA mit der vermuteten Struktur entspricht (Abb. 25). Dieses Signal könnte einem intronlosen A1(ins)-(Pseudo)gen entsprechen.

Es liegt nahe zu vermuten, daß die A1- und A1(ins)-mRNAs durch alternatives Spleißen aus einem Transkript entstehen. Da die genomische Southern-analyse mit dem Oligonukleotid A1,248/ins multiple Banden ergibt (nicht gezeigt), könnte jedoch auch ein separates Gen für die A1(ins)-mRNAs verantwortlich sein.

A1(ins)-Protein

Die Insertionssequenz kodiert zusätzliche 52 Aminosäuren verglichen mit dem A1. Unter der Annahme, daß der N-Terminus des abgeleiteten Proteins exakt dem Protein A1 entspricht, würde ein Protein von etwa 39 kDa mit einem berechneten isoelektrischen Punkt von etwa 9,6 resultieren (berechnet mit PCGENE). Die typische Domänenstruktur des hnRNP-Proteins A1 in dieser Region (38,42) ist erhalten geblieben. In Abb. 31 ist eine NOVOTNY-Analyse (120-122) des A1(ins)-Proteins dargestellt. Die Insertsequenz entspricht den Aminosäuren 250-306. Die Analyse zeigt keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Insertion und unmittelbaren Umgebung. Der A1-C-Terminus wird durch die Insertion um 52 Aminosäuren verlängert. Diese Domäne ist gekennzeichnet durch eine geringe α -Helix-Wahrscheinlichkeit und besitzt eine gewisse Homologie zu Cytokeratinen (54). Da der A1-Carboxyterminus die Nukleinsäure-Bindungseigenschaften des Proteins stark beeinflußt (42), könnte sich die Insertsequenz hier auswirken.

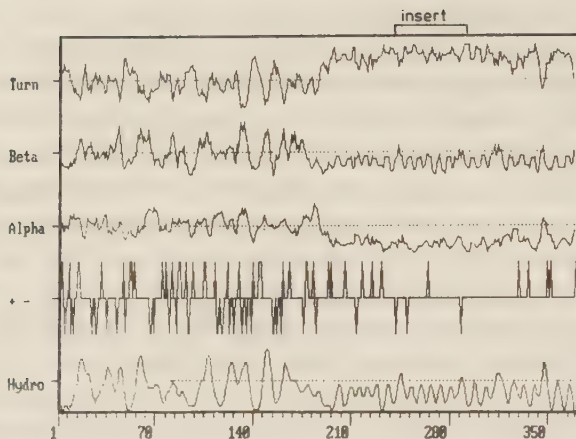


Abb. 31: Novotnyanalyse eines hypothetischen A1(ins)-Proteins (durchgeführt mit PCGENE 5.1) (120). Dieses Protein besteht aus dem Protein A1 mit der Insertion von 52 Aminosäuren (insert) nach Aminosäure 250. Fünf strukturelle Parameter sind angezeigt. Turn, Beta, und Alpha zeigen die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich ein Bereich von Aminosäuren zu β -Turn, β -Faltblatt oder α -helikalen Strukturen in der Polypeptidkette anordnen (121). +/- zeigt die Position und die Art von geladenen Aminosäuren an. Hydrophobizitätswerte für eine zentrale Aminosäure wurden über einen Bereich von 7 Aminosäuren gemittelt (122).

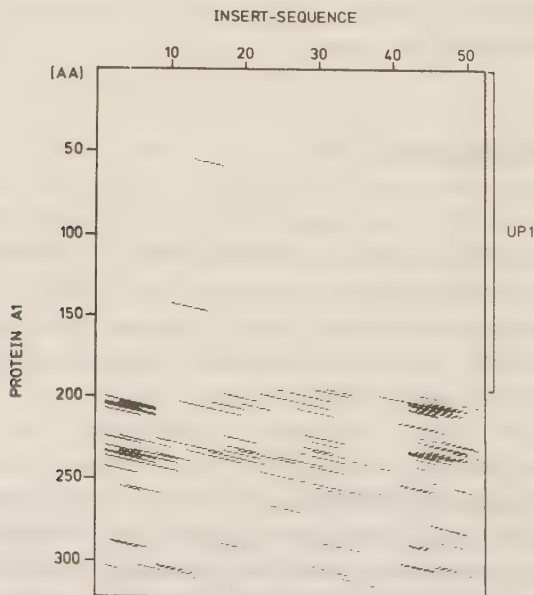


Abb. 32: Matrix-Vergleich der 52-Aminosäuren-Insert-Sequenz (waagrecht) gegen die 319 Aminosäuren des A1 (Parameter: MINMATCH = 4; MINPER = 75) (MICROGENIE, Beckman). AA = Aminosäuren.

Das Muster der Aminosäuresequenz ist im C-terminalen Bereich des A1 repetiert. In Abb. 32 ist ein Dot-Matrixvergleich gezeigt. Die Insertsequenz von 52 Aminosäuren (waagrecht) wurde mit dem Protein A1 (senkrecht) verglichen. Während im UP1-Teil des hnRNP-Proteins A1 (Aminosäuren 1-195) kaum Homologien erkennbar sind, finden sich zahlreiche Repetitionen im C-terminalen Teil des A1. Typische repetitive Motive sind zum Beispiel G-G-G-F oder F/Y-G-G-G.

Die hnRNP-Proteine A1 und A2 sind äußerst homolog. Dies ergibt der Vergleich der A1-Aminosäuresequenz mit der von A2, abgeleitet aus Peptidsequenzen (123) und A2-cDNA-Klonen (93) (nicht gezeigt). Interessant ist, daß die ersten 10 Aminosäuren des A1(ins)-Proteins, die nicht im A1 vorkommen (G-G-Y-G-G-G-P-G-Y), identisch sind mit den Aminosäuren 254-263 des Proteins A2. Weiterhin finden sich A2-homologe Bereiche im gesamten Insert. Die Proteine A1 und A2 sind, wie auch A1(ins) und A2, etwa 81 % homolog.

Es stellt sich die Frage, ob das A1(ins)-Protein ein bislang noch nicht charakterisiertes hnRNP-Protein repräsentiert. Wilk und Mitarbeiter (24) bestimmten die Aminosäurezusammensetzungen zahlreicher hnRNP-Proteine. Es zeigt sich, daß die berechnete Zusammensetzung des A1(ins)-Proteins zwar ähnlich der Zusammensetzung der B-Proteine ist, mit keinem der hnRNP-Proteine jedoch ausreichend übereinstimmt. Somit stellt das A1(ins)-Protein keines der beschriebenen Haupt-hnRNP-Proteine (24) dar. Dagegen spricht auch die schwache Expression der A1(ins)-mRNA in HeLa-Zellen. Eine genaue Betrachtung der zweidimensionalen Polyacrylamidgele (24) zeigt bei etwa 39 kDa, dem berechneten Molekulargewicht des A1(ins)-Proteins, neben den B-Proteinen noch schwächere Banden. Somit könnten Subfraktionen der hnRNP-Partikel oder der A1-Bindungsstellen im 40 S-Partikel mit A1(ins) besetzt sein. Man könnte deshalb spekulieren, daß über die Menge an A1(ins)-Protein in hnRNP-Komplexen eine Regulation ihrer biologischen Funktion stattfindet.

B. Merrill und K. Williams (Yale University, New Haven, USA) konnten zeigen, daß sich die hnRNP-C-Proteine C1 und C2 durch eine Insertion von 13 Aminosäuren unterscheiden (123). Deshalb könnten Insertionen ein allgemeines Bauprinzip der untereinander oft sehr ähnlichen hnRNP-Proteine (7,15,23,24) darstellen.

In poly(A⁺)-RNA aus der Ratte kommt neben den beiden A1-mRNAs von 1,5 und 1,9 kb noch eine größere Spezies von etwa 4,5 kb vor (54). Planck und Mitarbeiter (47) beobachteten, daß die 4,5 kb A1-mRNA Sequenzhomologie zur

1,7 kb A1-cDNA aufweist. So hybridisiert diese mRNA stark mit Sequenzen aus dem 5'-, mittleren und 3'-Bereich der A1-cDNA HDP-182. Die 4,5 kb-mRNA könnte deshalb in Analogie zum humanen A1 und A1(ins) Insertion(en) in die A1-Sequenz besitzen.

Isoformen des Proteins A1

Die Northern-Analysen mit A1(ins)- oder A1/15-spezifischen Oligonukleotiden zeigen, daß auch Proteinisoformen des äußerst konservierten hnRNP-Proteins A1 existieren müssen. Das A1,158g-Oligonukleotid ist komplementär zu einer A1/15-Sequenz, die einen Aminosäureaustausch beinhaltet (Ile → Thr). Ähnliche punktuelle A1-Isoformen wurden auch durch cDNA-Klonierung (57) und durch Sequenzieren des Proteins A1 aus HeLa (38) gefunden. Die zweidimensionale Gelelektrophorese löst ferner das A1 in mehrere distinkte Proteine auf (24). Alle diese Ergebnisse sind konsistent damit, daß das A1 analog den Histonen in zahlreichen Proteinisoformen in der Zelle vorkommt. Die Isoformen könnten zellzyklus- oder gewebespezifisch exprimiert werden (124).

Das Retropseudogen A1/15

A1/15 besitzt alle Merkmale eines Retropseudogens, wie fehlende Introns, den Rest eines Poly(A)-Bereichs sowie direkte Wiederholungen ("direct repeats") vor und hinter der A1-Sequenz (60). Der Leseraster ist intakt und kodiert ein dem A1 sehr ähnliches Protein. Es zeigt sich, daß sich das freie Leseraster in 5'-Richtung über das A1-Startkodon ausdehnt und weitere 44 Aminosäuren kodiert werden (siehe Seite 26). Das 5'-ATG weist allerdings nur eine schwache Ähnlichkeit zur Konsensussequenz für den Translationsstart (119) auf. Zudem ist das 5'-Ende von A1-mRNAs wahrscheinlich zu kurz, als daß das 5'-ATG transkribiert werden könnte (siehe Seite 18).

Retropseudogene sind normalerweise transkriptional inaktiv. Das liegt daran, daß der Promotor für RNA-Polymerase II vor der mRNA-Cap-Stelle des Gens lokalisiert ist und nicht selber transkribiert wird. Somit entsteht keine Kopie des Promotors, die mit der mRNA-Kopie zusammen reintegriert werden kann. Das reverse Transkript integriert irgendwo im Genom ohne den zugehörigen Promotor und ist somit transkriptional inaktiv (60).

So ist zum Beispiel das Metallothionin-Retropseudogen inaktiv, trotz der intakten kodierenden Region des Pseudogens (62). Ähnliches wurde für zwei Retropseudogene der HMG17-Multigenfamilie gezeigt (63). Mittlerweile sind allerdings auch Ausnahmen von dieser Regel bekannt. Diese sind die Multigenfamilie des Interferon- α (64), das Hühner-Calmodulin-Pseudogen (65), das Ratten-Preproinsulin-Pseudogen (66), das menschliche Phosphoglycerat-Kinase Pseudogen (67) sowie in neuester Zeit das humane JUN-Protoonkogen (68). Im Fall des Preproinsulins und der Phosphoglycerat-Kinase stammen die Retrogene aller Wahrscheinlichkeit nach von aberrant 5' initiierten Transkripten ab. Die Promotorregion wurde kotransferiert und verlieh der neuen Kopie transkriptionale Aktivität. Primer-Extensions Studien (3.1.5) lassen einen solchen Fall für A1/15 ausschließen, da die 5'-"direkte Wiederholung" (direct repeat) zu nahe an der kodierenden Region liegt.

Zwar lassen sich A1-mRNAs nachweisen, die A1/15-Sequenzen tragen (Abb. 16), genomische Southernanalyse zeigt aber multiple Banden mit der gleichen Probe (Abb. 17). Somit ist wahrscheinlich, daß die mRNAs von einem anderen Gen als A1/15 transkribiert werden.

Um die Frage der Transkription von A1/15 zu klären, wurde ein 1,4 kb großes Restriktionsfragment, welches den vermeintlichen Promotor tragen müßte, in den pBC12/Seap-Vektor (70) kloniert (Abb. 18/19). Mit dem resultierenden Plasmid wurden COS-Zellen transfektiert. Die Analyse der Zellüberstände zeigt keine Promotoraktivität der A1/15-Sequenz an (Abb. 20). Dies läßt vermuten, daß A1/15 nicht transkribiert wird. Ein Vergleich der hier erzielten Sensitivität des hier verwendeten Promotortests (sekretierte Alkalische Phosphatase) mit dem herkömmlichen CAT-Verfahren (125) ergibt eine gut vergleichbare Empfindlichkeit beider Tests (70,126).

Ein falsch-negatives Ergebnis läßt sich allerdings nicht ausschließen. So könnte das humane Retroposon in den aus Affen stammenden COS-Zellen (74) nicht exprimiert werden, da nötige Transkriptionsfaktoren nicht zur Verfügung standen. Weiterhin bliebe eine gewebespezifische Expression von A1/15 wahrscheinlich unbemerkt (73).

Somit konnten in dieser Arbeit keine Hinweise darauf gefunden werden, daß das A1 durch intronlose Gene kodiert wird (siehe Einleitung). Es kann jedoch sein, daß andere intronlose Gene in der Multigenfamilie des A1 existieren.

Analyse von Promotorsequenzen

Das Studium des putativen A1/15-Promotors wurde zum Anlaß genommen, eine statistische Analyse von 94 weitgehend humanen Promotorbereichen mit TATA-Homologie durchzuführen (Tabelle 5A, 5B, 5C) (siehe Anhang). Die letzte umfangreiche Analyse dieser Art stützte sich auf die Sequenzen von 60 eukaryotischen Promotoren, darunter wenig humane Sequenzen (69). Das Ergebnis dieser Studie (5'-T-A-T-A-A/T-A-A/T-3') wurde im wesentlichen bestätigt. Die Konsensussequenz Pyr-A-Pyr für den mRNA-Startpunkt kann hingegen nicht bestätigt werden. Für den Startpunkt ergibt sich eine Präferenz für Purine (82 % der Fälle). Die nähere Umgebung des mRNA-Startpunkts zeigt keine signifikante Konsensussequenz. Die Entfernung zwischen TATA-Sequenz und mRNA-Start liegt in 80 % der Fälle zwischen 35 und 22 bp, was in Übereinstimmung mit den Daten von Breathnach und Chambon (69) ist.

Homologie des A1 zum ABA-induzierbaren Protein aus Mais

Ein Vergleich der A1-Sequenz mit der abgeleiteten Peptid-Sequenz einer Mais-mRNA, die durch Wasser-Streß, Verwunden der Blätter oder durch das Pflanzenhormon "abscisic acid" (ABA) induzierbar ist (127), zeigt eine Ähnlichkeit der beiden Sequenzen von etwa 56 % (Abb. 33). Interessanterweise überlappt die Sequenz des abgeleiteten ABA-induzierbaren Proteins (157 Aminosäuren) gerade den Übergang in der Domänenstruktur des A1, so daß das pflanzliche ABA-Protein quasi eine verkürzte Ausgabe des Säuger-hnRNP-

hnRNP A1	106	KIFVGGIKEDTEEHRLRDYFEQYQKIEVIEIMDRGSGKKRGFAFVTFDD	155
abaresp	9	RCFVGGLAWATSNESLENAFASYGEILDSKVITDRETGRSRGFGFVTFSS	58

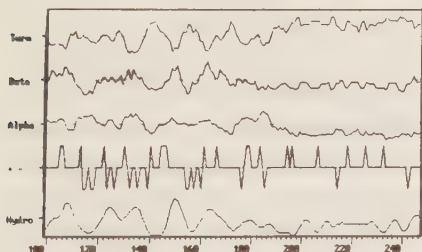
hnRNP A1	156	HDS.VDKIVIQKYHTVNGHNCEVRKALSQEMASASSSQRGRSGSGNFGG	204
abaresp	59	ENSHLDAIENMNGKELDGRNITVNOQSRGGGGGGGCGGGRGGGGYGGG	108
hnRNP A1	205	GRGGGFGGNINP.....GRGGNFSGRGGFGGSR..GGGGYGGSGDGY	244
abaresp	109	RRDGGYGGGGYGGRRGGGGYGGGGYGGRRGGGGYGGGGGGW	155

Abb. 33: Vergleich des hnRNP-Proteins A1 mit der Aminosäuresequenz des ABA-induzierbaren Proteins (abaresp). Die RNP-Konsensus-Sequenz (41) ist mit * gekennzeichnet.

Proteins A1 darstellt (Abb. 34). Der hohe Grad an Ähnlichkeit zwischen A1 und ABA-induzierbarem Protein beruht hierbei nicht einfach auf dem hohen Gehalt an Glycin. Die NOVOTNY-Analyse (120) zeigt, daß die Domänenstruktur des ABA-induzierbaren Proteins der des A1 im korrespondierenden Bereich äußerst ähnlich ist. Im Gegensatz hierzu ist die Sequenz eines weiteren ABA-induzierbaren Gens aus Reis dem A1 nur schwach ähnlich, obwohl das abgeleitete Protein ebenfalls glycinreich und basisch ist (128). Dies gilt ebenso für glycinreiche Zellwandproteine aus der Bohne (129).

HnRNP-Proteine aus Pflanzen wurden meines Wissens nach bislang noch nicht beschrieben. Aufgrund der aufgeführten Daten liegt nahe zu vermuten, daß das ABA-induzierbare Protein ein RNA-bindendes Protein darstellt. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß die RNP-Konsensus-Sequenz (41), die in zahlreichen eukaryotischen Proteinen bis hinunter zum Poly(A)-bindenden Protein aus *Saccharomyces Cerevisiae* (130) vorkommt, perfekt konserviert ist (siehe Abb. 33). Die gleiche Entdeckung machten vor kurzem Mortenson und Dreyfuss (131).

A. PROTEIN A1 (AA 99-246):



B. ABA-RESPONSIVE PROTEIN:

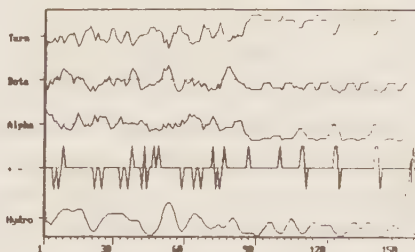


Abb. 34: NOVOTNY-Analyse des Proteins A1 im Bereich der Aminosäuren 99-244 und des ABA-induzierbaren Proteins (berechnet mit PCGENE 5.1).

PCR-Analyse der A1-Genstruktur

Zur A1-Multigenfamilie gehören wahrscheinlich zahlreiche Pseudogene, die eine Suche nach aktiven (wahrscheinlich intronhaltigen) Genen stark erschweren (siehe 3.2). Die PCR-Analyse von genomischer DNA mit A1-Oligonukleotiden kann eine Möglichkeit darstellen, Intronsequenzen ohne vorherige Klonierung zu bestimmen. Unter der Annahme, daß A1-Intronsequenzen weniger repetiert sind als die Exonsequenzen, ließe sich eine mit PCR erhaltene Intronsequenz zur Suche des A1-Gens in einer Bibliothek einsetzen. Folgende Probleme stellen sich hierbei: 1.) Das Intron darf nicht zu groß sein, da die Länge der Syntheseprodukte etwa 2kb in genomischer DNA nicht überschreitet (81). Bei längeren Targetsequenzen (4,5 kb) verringert sich auch bei homogener DNA die Ausbeute des Syntheseprodukts drastisch (siehe Abb. 23). Die Länge eines Introns in Strukturgenen kann jedoch 2 kb deutlich übersteigen (10,132-134), zudem könnten mehrere kleine Introns die Entfernung zwischen den Oligonukleotid-Sequenzen auf über 2 kb vergrößern. 2.) Der Bindungsbereich eines Oligonukleotids könnte auf einen Exon-Intron Übergang fallen. Dies würde verstärkt für Gene mit zahlreichen kleineren Introns (135) gelten. Um diese Probleme einzugrenzen, wurde der Abstand von A1-Oligonukleotiden variiert zwischen 0,1 und etwa 1 kb (Tabelle 7/8).

Man würde bei der PCR-Analyse von genomischer DNA mit A1-Oligonukleotiden erwarten, daß durch Pseudogene wie A1/15 Syntheseprodukte mit dem von der cDNA her berechneten Molekulargewicht entstehen. Das Experiment bestätigt diese Erwartung (Abb. 25). Die A1-Pseudogene fungieren auf diese Weise als eine Art "interne Kontrolle" des Experiments. Die Sequenzanalyse des 380 bp Produktes der PCR 2s-124a (PCR-A-Fragment) zeigt in Übereinstimmung hiermit A1a-Sequenz (Abb. 28). Ebenso findet sich bei der Analyse der Genstruktur des hnRNP-Proteins A2 eine mit A2-cDNA stark hybridisierende Bande (Abb. 29). Die Sequenzierung dieser Bande ergibt die erwartete A2-Sequenz (T. Koza, S. te Heesen und K. P. Schäfer, unveröffentlicht).

Neben den erwarteten Banden zeigen sich Syntheseprodukte, die bis zu etwa 500 bp mehr als berechnet aufweisen (PCR 2s-158; Abb. 25). Es stellt sich die Frage, ob diese Banden mit größerem Molekulargewicht tatsächlich wie angenommen Insertionen in A1-Sequenzen enthalten. Als Modellfall hierfür wurde die PCR 2s-124a untersucht. Diese PCR ergibt neben dem berechneten Produkt von 380 bp (PCR-A-Fragment), welches A1-Sequenz enthält (Abb. 28) noch eine weitere Bande bei etwa 540 bp. Dieses Produkt wurde reamplifiziert und in M13 kloniert. Zwei Klone, die mit dem PCR-B-Fragment hybridisierten,

wurden erhalten und die PCR-B-Sequenz vollständig bestimmt.

Die Analyse ergibt, daß außer den Oligonukleotiden keine A1-Sequenz im PCR-B-Fragment vorkommt (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ist zunächst schwer verständlich, da die Bande stark mit A1 α -cDNA hybridisiert (Abb. 25B) und reproduzierbar entsteht (Abb. 26/27). Eine Erklärung hierfür wäre, daß die hybridisierende Bande ein Gemisch verschiedener Fragmente (A1 und Nicht-A1) darstellt. Von diesem Gemisch ausgehend wurde die DNA, um genügend Material für die Sequenzierung zur Verfügung zu haben, weitere 35 Zyklen amplifiziert. Da verschiedene DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden können (siehe Abb. 27), ist wahrscheinlich die in Abb. 25 hybridisierende A1-Sequenz ausgedünnt worden. In Übereinstimmung hiermit ergab die direkte Sequenzierung der 540 bp-DNA, daß gelegentlich die A1-Sequenz der PCR-B-Sequenz überlagert war (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Methode der PCR unter Berücksichtigung der oben genannten Einschränkungen ein geeignetes Mittel zur Untersuchung der A1-Multigenfamilie darstellt. Die Komplexität der bei der genomischen Southern-Analyse beobachteten Banden (zum Beispiel mit A1,158g; Abb. 17) wird bei der PCR auf wenige Banden reduziert (Abb. 25B). Ich möchte allerdings darauf hinweisen, daß die PCR ein komplexes experimentelles System darstellt, in dem zahlreiche Reaktionsprodukte entstehen können, die wenig oder nichts mit der eigentlichen Zielsequenz zu tun haben. Findet in einem frühen Stadium der Polymerase-Kettenreaktion eine Fehlpaarung von Oligonukleotiden an die DNA statt, so ist bei den darauffolgenden Zyklen die Oligonukleotidsequenz perfekt integriert und unspezifische DNA kann amplifiziert werden (siehe Abb. 25A und B). Weiterhin kann spezifisch hybridisierende DNA, wie das 540 bp PCR-B-Fragment, verlorengehen. Somit sollten konkrete Aussagen immer durch die Sequenzanalyse überprüft werden.

Untersuchungen mit as-Oligonukleotiden

Antisense-Oligonukleotide (as-Oligonukleotide) gelangen in kultivierte Zellen und hybridisieren spezifisch an komplementäre RNA (97-99). Es konnte gezeigt werden, daß as-Oligonukleotide virale Vermehrung in vivo hemmen (100-102). Weiterhin gibt es Beweise, daß as-Oligonukleotide eine Inhibition der Translation bewirken sowohl in vitro (103-105) wie in vivo (106). Daneben können DNA:RNA-Hybride in der Zelle von einer RNase H-ähnlichen Aktivität zerstört werden (107). Zahlreiche zellbiologische Fragen konnten mit einem as-Oligonukleotid-Ansatz gelöst werden (108-112).

In dieser Arbeit wurde das Verfahren eingesetzt, um über eine Inhibierung von A1-mRNAs Aussagen über die biologische Bedeutung des Proteins A1 zu gewinnen. Es zeigt sich, daß das Oligonukleotid A1,32 HeLa-Zellen binnen 24 h zum Absterben bringt (Abb. 30). Der gleiche Effekt wird auch bei A1,124 α beobachtet, nicht aber bei A1,124 β . Somit beruht der Effekt nicht auf einer allgemeinen, sequenzspezifischen Toxizität der Oligonukleotide.

Der toxische Effekt korreliert mit der Häufigkeit der A1-mRNAs in HeLa-Zellen. A1 β -mRNA wird im Gegensatz zu A1 α in HeLa nicht oder nur wenig exprimiert (siehe Abb. 8). A1,32 stellt ein Gemisch aus 32 Sequenzen (siehe Tabelle 4) dar und kann an alle exprimierten A1 α -mRNAs binden, welche keine Abweichung in den Aminosäuren 32-36 des A1 kodieren. Die Bindung im 5'-Bereich bewirkt dann, daß nur ein schätzungsweise inaktives A1-Fragment, bestehend aus den Aminosäuren 1-32, translatiert wird. Somit würde die Versorgung mit Protein A1 in der Zelle abbrechen, was den toxischen Effekt von A1,32 erklärt. Das Oligonukleotid A1,124 α besitzt zwar keine degenerierte Sequenz, ist aber komplementär zu stark exprimierter A1 α -mRNA (Abb. 8). In Einklang mit der obigen Hypothese bringt A1,124 α ebenfalls HeLa-Zellen zum Absterben.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das hnRNP-Protein A1 wahrscheinlich essentiell für die Zelle ist. Dies wäre in Übereinstimmung mit der Menge des Proteins im Zellkern und den hohen Grad an Konservierung des A1 bei Säugern. Die Funktion des A1 im hnRNP-Komplex ist zur Zeit vollkommen unklar. Die anti-sense-Oligonukleotidmethode könnte dazu beitragen, Licht auf die biologische Rolle des A1 in hnRNA-Prozessierungskomplexen zu werfen. Dies bleibt zukünftigen Experimenten vorbehalten.

5. M A T E R I A L I E N

5.1 Bakterienstämme

Für die meisten Plasmide wurde der E. Coli Stamm DH5 α {F⁻ endA1 hsdR17 (rk⁻mk⁺) supE44 thi recA1 gyrA96 relA1 θ 80d lacZ Δ M15} (136) als Wirt verwendet. E. Coli JM103 { Δ (lac-pro) hsdR4 strA thi supE endA sbcB15 (F-traD36 proAB lacI^q lacZ Δ M15)} (137) wurde für Klonierungen im Bakteriophagen M13 eingesetzt. JM103 wurde bei Pharmacia (Freiburg) gekauft. Als Wirt für den cDNA Vektor λ gt11 diente E. Coli Y1088 {supE supF metB trpR hsd⁻ hsdM⁺ tonA21 strA Δ lacU169 proC::Tn5 (pMC9)} (53).

5.2 Zelllinien

HeLa S3 Suspensionszellen sind ein Geschenk von A. Krämer, Biozentrum Basel, Schweiz). COS-Zellen (Green monkey kidney cells, transformiert mit origin-defektem SV40) (74) wurden freundlicherweise von R. Knippers (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt.

5.3 Vektoren/Klone

pUC18/19 sowie M13mpl8/19 (138) wurden bei Pharmacia (Freiburg) gekauft. pUC8 (145) ist ein Geschenk von A. Keller (Byk Gulden, Konstanz). pBC12/Seap und pBC12/Seap/RSV (70) wurden von H. Eistetter (Byk Gulden, Konstanz) zur Verfügung gestellt. Die genomischen λ I α -Klone λ A1/2, λ A1/6, λ A1/15, λ A1/19, λ A1/29 (46) wurden von K. Melchers (Byk Gulden Konstanz) zur Verfügung gestellt.

5.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden bei Boehringer Mannheim gekauft. Taq-DNA-Polymerase stammt von Perkin-Elmer (Offenbach). M-MLV Reverse Transkriptase wurde bei BRL gekauft, BSA (nukleasefrei) bei Pharmacia (Freiburg). Sequenase-Kit wurde bei Renner (Darmstadt) gekauft. DNA Fragmente wurde radioaktiv markiert mit Hexameren-Labeling Kit (Amersham Buchler RPM 1601.).

5.5 Reagenzien/Membranen

Acrylamid (2 x krist.)

Agarose/Topagarose

Ampicillin (Na-Salz)

Bacto-Agar

Bacto-Trypton/Pepton

Brij 58

CsCl

DC Kieselgelplatten F₂₅₄

DE 52 Cellulose

Fluka oder Serva

Sigma

Sigma

Gibco/BRL

Gibco/BRL

Serva

Roth

Merck

Whatman

DTT
 Formamid
 Hefe-Extrakt
 Hefe-tRNA
 Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
 Kalziumchlorid
 Methylquecksilberhydroxid
 Na-Desoxycholat
 Nitrocellulose-Filter BA85
 Nonidet P40 (NP40)
 Nylonmembranen Hybond-N
 Oligo(dT)-Cellulose
 p-Nitrophenylphosphat
 Penicillin-G
 Polyethylenglycol 6000
 Polyvinylpyrrolidon C600
 Rinderserumalbumin (BSA)
 SDS (Na-Dodecylsulfat)
 Streptomycin
 Tris (Tris{Hydroxyamino}methan)
 Vanadylribonukleosid-Komplex
 Xgal
 Zellkulturmedien/Seren

Sigma
 Sigma
 Gibco/BRL
 Boehringer Mannheim
 BRL
 Merck
 Ventra
 Sigma
 Schleicher & Schuell
 Sigma
 Amersham
 PL-Biochemicals
 Sigma
 Sigma
 Fluka
 Sigma
 Pharmacia
 Serva oder Merck
 Sigma
 Merck
 BRL
 Boehringer Mannheim
 Gibco/BRL

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität von Merck oder Baker bezogen.

5.6 Radiochemikalien

(α - 32 P)dATP, 800 Ci/mmol
 (α - 32 P)dCTP, 3000 Ci/mmol
 (γ - 32 P)ATP, 6000 Ci/mmol
 (α - 35 S)dATP, 1200 Ci/mmol

NEN
 Amersham Buchler
 NEN
 NEN

6. METHODEN

6.1 Bakterien

6.1.1 Kultivierung (140-142)

E. Coli JM103 wurde auf M9-Agarplatten ausgestrichen. Einzelne Kolonien hiervon wurden auf M9-Agarplatten propagiert und benutzt zur Herstellung kompetenter Zellen. M9-Agar wurde wie bei Maniatis beschrieben hergestellt: 6 g Na_2HPO_4 + 3 g KH_2PO_4 + 0,5 g NaCl + 1 g NH_4Cl + 15 g Bacto-Agar ad 1 l mit aqua bidest. (pH 7,4), dann autoklaviert und 2 ml 1 M MgSO_4 + 10 ml 20 % Glucose + 0,1 ml 1 M CaCl_2 + 0,5 ml 1 % Thiamin. E. Coli DH5 α wurde in der gleichen Weise wie JM103 gehalten, aber auf LM-Agar (10 g Bacto-Tryptone + 5 g Hefeextrakt + 5,8 g NaCl + 2,5 g MgSO_4 ad 1 l mit aqua bidest.) (143). Für E. Coli Y1088 wurde LB-Agar plus 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin verwendet, um das interne Plasmid (pMC9) dieses Stamms zu erhalten. LB-Agar ist 10 g Bacto-Trypton + 5 g Hefe-extrakt + 5 g NaCl + 15 g Bacto-Agar ad 1 l mit aqua bidest. (pH 7,0). LB-Medium hat die gleiche Zusammensetzung, der Agar wird weggelassen.

6.1.2 Transformation von E. Coli Zellen

6.1.2.1 CaCl_2 -Verfahren (140)

Eine Einzelkolonie von JM103 von einer M9-Agarplatte wurde in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der über Nacht-Kultur in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben, und bei 37°C geschüttelt, bis die Absorption bei 600 nm (A_{600}) bei etwa 0,5 lag (1,5 - 2 h). Die Zellen wurden pelletiert (GSA-Rotor, 5000 rpm, 10 min, 4°C). Die nun folgenden Schritten wurden im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in 30 ml 0,1 M CaCl_2 suspendiert und 20 min auf Eis stehengelassen, anschließend pelletiert wie oben. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml 0,1 M CaCl_2 vorsichtig suspendiert und über Nacht bei 0°C gelagert. DNA (in 100 μl 0,1 M CaCl_2) wurde zu je 200 μl der Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 1 h auf Eis stehengelassen. Dann erfolgte ein Hitzeschock (42°C, 2,5 min). 1,2 ml LB-Medium wurde zugegeben und die Zellen konnten sich 1 h bei 37°C regenerieren. 1/5 oder 1/10 der Zellen wurden dann ausplattiert auf LB-Agarplatten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, der Rest der Zellen konzentriert durch leichtes Zentrifugieren (20-30 Sekunden) und ebenfalls ausplattiert. Die auf diese Weise hergestellten kompetenten Zellen ergaben maximal 1-2 x 10⁶ Kolonien/ μg ccc-Plasmid ("Supercoil").

6.1.2.2 Hanahan-Verfahren

Dieses Verfahren wurde angewandt, wenn besondere Ansprüche an die Kompetenz der Zellen gestellt wurden. Die auf diese Weise behandelten Zellen nahmen bis zu 80x mehr DNA stabil auf (1-8 x 10⁷ Kolonien pro μg ccc-Plasmid). Die hier beschriebene Methode enthält kaum Abweichungen von dem publizierten Verfahren (143). Eine Einzelkolonie von DH5 α -Zellen auf LM-Agar wurde in 5 ml SOB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. SOB-Medium ist 2 % Bacto-Tryptone + 0,5 % Hefeextrakt + 10 mM NaCl + 2,5 mM KCl autoklavieren, dann je 10 mM MgCl_2 und MgSO_4 zugeben. 2 ml der Zellen wurden in 100 ml vorgewärmtes SOB-Medium in einem 1000 ml-Riffelkolben gegeben, und bei 37°C heftig geschüttelt, bis die Absorption der Zellsuspension bei 550 nm (A_{550}) bei 0,5-0,55 lag (1,5 h). Zweimal 30 ml der Zellen wurde pelletiert (SS34, 5000 rpm, 4°C, 10 min). Die Zellpellets

wurden in 10 ml TFB {10 mM K-MES + 100 mM RbCl + 45 mM MnCl₂ + 10 mM CaCl₂ + 3 mM (NH₃)₆CoCl₃} (Kühlraum, 0°C) mit einer 10 ml-Pipette suspendiert. Anschließend wurde 10 ml TFB zugegeben und die Zellen 15 min auf Eis stehengelassen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml kalten TFBs suspendiert. 70 µl DMSO wurde zugegeben und die Zellen 5 min bei 0°C belassen, dann 70 µl 2,25 M DTT/20 mM KOAc (pH 6,0) zugegeben und 10 min bei 0°C belassen. 70 µl DMSO wurden erneut zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Je 200 µl der Zellen wurden zur DNA (1-2 µl) gegeben, dann 1 h auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock (42°C, 1,5 min), anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt. Dann wurde 800 µl SOC (= SOB plus 20 mM Glucose) Medium zugegeben und 1 h bei 37°C mit leichtem Schütteln inkubiert. 1/5 oder 1/10 der Zellen wurden dann ausplattiert auf LM-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin, der Rest der Zellen konzentriert durch leichtes Zentrifugieren (20-30 Sekunden) und ebenfalls ausplattiert.

6.1.2.3 M13-Transformation (144)

Kompetente JM103 Zellen wurden wie oben beschrieben präpariert, und mit 1/10 - 1/5 des Ligationsansatzes auf Eis für 1 h stehengelassen. Sodann wurden die Zellen in 3 ml TBY-Agar {1 % Bacto-Trypton + 0,5 % NaCl + 0,05 % Hefeextrakt + 0,7 % Bacto-Agar, autoklavieren, auf 42-50°C abgekühlt, dann 1 mM IPTG und 1 mM Xgal zugegeben} überführt, gemischt, und auf LB-Platten ausplattiert. IPTG wurde als 0,1 M Stammlösung in sterilem aqua bidest., und Xgal als 0,1 M Lösung in Dimethylformamid bei -20°C gelagert.

6.2 D N A

6.2.1 Isolierung von DNA

6.2.1.1 Phenolextraktion / Ethanolfällung (140-142,145)

Um Nukleinsäuren von anhaftenden Proteinen zu befreien, wurde ein gleicher Volumenanteil Phenol (mit TE = 10 mM Tris/HCl pH 7,4 + 1 mM EDTA gesättigt) und eine kleine Menge CHCl₃ zugefügt, gemischt ("vortex"), anschließend zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Gefäß gegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, keine an der Interphase befindlichen Proteine mitzunehmen. Die Extraktion wurde wiederholt. Zur Entfernung des Phenols in der wäßrigen Lösung wurde entweder 2 x mit CHCl₃ oder mit sterilem aqua bidest. gesättigtem Diethylether extrahiert. Nach jeder Phenolextraktion schloß sich auch eine Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol an. Hierzu wurden 2,5 - 3 Vol. an absoluten Ethanol (4°C) zugefügt, gemischt, und direkt 10-30 min zentrifugiert (145). Wenn sich nicht schon Salz in der Nukleinsäurelösung befand, wurde 1/10 Vol. 8 M LiCl zugegeben und gemischt vor Ethanolzugabe. Der Überstand wurde verworfen, das Nukleinsäurepellet mit 1 ml 70 % Ethanol (0°C) kurz gewaschen, anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet und in TE {10 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA} gelöst.

6.2.1.2 Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA (146)

5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden mit einer Einzelkolonie plasmidtragender E. Coli Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml hiervon wurden zentrifugiert (30 sec), der Überstand sorgfältig entfernt. Das Zellpellet wurde in 400 µl TELT-Puffer {50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 62,5 mM EDTA + 2,5 M LiCl + 0,4 % Triton X-100 (v/v)} mit einer blauen Gilsonspitze suspendiert. Anschließend wurden 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml frisch in aqua bidest. angesetzt) zugegeben, für 3 sec gemischt ("Vortex"), dann direkt in ein kochendes Wasserbad für 1 min plaziert, anschließend in Eiswasser 5 min lang abgekühlt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt (8 min, RT). Das entstandene Pellet bestehend aus Zelldebris wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde auf Eis gestellt, 1 ml kalten absoluten Ethanols zugefügt, gemischt und 10-15 min bei RT zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 50 µl TE {10 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA} gelöst. Je nach Plasmid und E. Coli-Stamm ergab sich 1-5 µg DNA, die direkt der Restriktionsanalyse unterworfen werden konnten. Bei genauer Einhaltung aller Schritte dieser Methode war keine Phenol/CHCl₃-Extraktion erforderlich; die DNA ließ sich akkurat schneiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen.

6.2.2.3 Großpräparation von Plasmid-DNA (140-142,147)

500 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden mit der plasmidtragenden E. Coli Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden präzipitiert (GSA/5000 rpm/4°C/10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml kalten TE {10 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA} suspendiert, anschließend 200 ml TE zugefügt und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Rohrzucker-Lösung {25 % Saccharose + 50 mM Tris/HCl pH 8,0} resuspendiert und in SS34 (JA20) Zentrifugenröhrchen überführt. 3,4 ml Lysozymlösung {10 mg/ml in 50 mM Tris/HCl pH 8,0} wurden zugefügt, gemischt, dann 5 min bei 0°C stehengelassen. 3,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 wurden dann zugegeben, gemischt und wieder 5 min auf Eis stehengelassen. Sodann wurden 10 ml Detergenzlösung {0,4 % Na-Desoxycholat (w/v) + 65 mM EDTA + 50 mM Tris/HCl + 1 % Brij 58 (w/v) pH 8,0} zugefügt, gemischt, und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zelldebris wurde abzentrifugiert (SS34, 20000 rpm, 1 h, 0°C oder Ti60, 30000 rpm, 30 min) und der Überstand vorsichtig in ein steriles 50 ml Falcon-Gefäß überführt. 0,9 g festes CsCl pro ml Überstand wurde zugefügt, gelöst, dann 0,75 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und die Plasmid-Lösung in TiV65-Gefäße gefüllt. Es erfolgte Dichtegradienten-Zentrifugation (TiV65, 50000 rpm, 14°C, über Nacht) und die untere Bande Plasmid-Bande wurde bei Normallicht von der oberen, dünneren Bande aus chromosomaler DNA und "open circular" Plasmid abgetrennt. Für Transfektionsversuche von eukaryotischen Zellen wurden die Plasmidbanden gesammelt und erneut in CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert. Das Volumen der gezapften Banden wurde gemessen und 1,5 Vol. TE sowie 1-2 x Vol. (Bande plus TE) kalten Isopropanols (mindestens 67 % Endkonzentration) zugefügt, 20 min auf Eis stehengelassen und die DNA pelletiert (16000xg, 20 min, 0°C). Die großen, rötlichen DNA-Pellets wurden in 2 ml TE gelöst, 1 x Phenol/CHCl₃-, 2 x CHCl₃-extrahiert und ethanolgefällt. Die Ausbeute betrug in Abhängigkeit vom E. Coli-Stamm und Vektor 0,1 - 6 mg ccc-Plasmid aus 500 ml Kultur.

6.2.2.4 Präparation von kleinen Mengen λ-DNA (140)

5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie E. Coli Y1088 oder Q358 angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 5 µl dieser Kultur wurden in 5 ml LB überführt und 6-7 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 300 µl der Zellen entnommen, 300 µl SM {100 mM NaCl + 50 mM Tris/HCl + 8 mM MgSO₄}

und 5-50 μ l Phagenlysat hinzugefügt und die Phagen 20 min bei 37°C inkubiert zur Adsorption. Die infizierten Zellen wurden in 5 ml SM gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Entstandener Zelldebris wurde abzentrifugiert (16000 x g, 10 min, 0°C) und das Lysat mit RNase A (2,5 μ g/ml) und DNase I (10 μ g/ml) verdaut (45 min, 37°C). Die λ -Phagen wurden ausgefällt durch Zugabe von 2,5 ml PEG-Lösung [20 % PEG 6000 + 2 M NaCl in SM], 1 h Inkubation bei 0°C mit nachfolgender Zentrifugation (16000 g/10 min/4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Phagenpellet in 300 μ l SM [100 mM NaCl + 50 mM Tris/HCl + 8 mM MgSO₄] aufgenommen, sodann mit CHCl₃ extrahiert und die Phagenproteine durch Zugabe von 80 μ l 0,2 M EDTA und 20 μ l 10 % SDS-Lösung 10 min bei 65°C denaturiert. Die Proteine wurden mit zwei Phenol-extraktionen entfernt, die DNA ethanolgefällt, 3 x mit 350 μ l 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, sodann in 25 μ l TE gelöst. Die Ausbeute betrug 1-10 μ g λ -DNA.

6.2.1.5 Großpräparation von λ -DNA (140-142,148)

5 ml einer 7 h-Kultur Y1088-Zellen (siehe oben, 6.2.1.4) wurden mit 5 ml SM [100 mM NaCl + 50 mM Tris/HCl + 8 mM MgSO₄] versetzt und mit 10-50 μ l Phagenlysat infiziert (15 min, 37°C), sodann in 500 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Bakterieller Debris wurde abzentrifugiert (GSA, 7000 rpm, 10 min, 0°C) und der Überstand in ein neues Gefäß gegeben. 50 g PEG 6000 und 30 g NaCl wurden zugefügt, auf Eis mit einem Magnetprüher gelöst, sodann 1 h bei 0°C stehengelassen und zentrifugiert wie oben. Das erhaltene Pellet (Phagen stark mit RNA/DNA/Protein kontaminiert) wurde in 3 ml SM aufgenommen und 2 x mit 3 ml CHCl₃ extrahiert. Die wäßrige Phase wurde auf einem CsCl-Stufengradienten in einem SW40-Zentrifugationsgefäß aufgetragen [Stufengradient: 1 ml CsCl der Dichte 1,7 g/ml; 1,5 ml CsCl 1,5 g/ml; 1,5 ml CsCl 1,4 g/ml in SM] und 2 h bei 22000 rpm (18°C) zentrifugiert. Die Phagenbande an der Interphase 1,4 $\rightarrow$ 1,5 g/ml wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein VTI65-Zentrifugationsgefäß überführt, mit CsCl (1,479 g/ml in SM) aufgefüllt und über Nacht zentrifugiert (45000 rpm, 18°C). Die Phagenbande wurde abgenommen und 1 h gegen SM dialysiert (RT). Pro 500 μ l Dialysat wurden 150 μ l 0,2 M EDTA und 40 μ l 10 % SDS zugefügt, gemischt, dann 20 min bei 65°C inkubiert und die Phagenproteine durch mehrfache Phenol/CHCl₃-Extraktion entfernt. Die Phagen-DNA wurde von Phenol/CHCl₃-Resten durch Dialyse gegen TE [10 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA] befreit (2 l, 4 h, RT, 4 x wechseln). Die DNA wurde nicht ausgefällt. Die Ausbeute betrug 100 μ g - 1 mg λ -DNA.

Die CsCl-Zentrifugationsschritte konnten eingespart werden unter Einsatz der kürzlich publizierten Methode von Reddy et al. (148). Hierbei wurden die PEG präzipitierten Phagen/RNA/DNA/Proteine in TM [50 mM Tris/HCl + 10 mM MgSO₄] aufgenommen und 2 x mit CHCl₃ extrahiert. Die Lösung wurde auf eine mit TM äquilibrierte DEAE-Säule (1,5 x 20 cm Material in einer 50 cm Säule) gegeben und mit TM überschichtet. Die Phagen wurden von der Säule nicht zurückgehalten und befanden sich im Durchfluß, die Nukleinsäurekontaminationen wurden hingegen adsorbiert. Zwei Säulenvolumen wurden aufgefangen, 3,2 ml 5 M NaCl und 26,7 ml kaltem Isopropanol zugefügt, 15 min bei 20°C stehengelassen und die Phagen abzentrifugiert (GSA, 7000 rpm, 0°C, 10 min). Die pelletierten Phagen wurden in 1 ml TE [10 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA] suspendiert, 2 x Phenol/CHCl₃-extrahiert und gegen TE dialysiert.

6.2.1.6 Präparation von λ CI¹⁸ Sam7 DNA (149)

λ -Sam7 DNA diente zur Herstellung von DNA-Molekulargewichtsmarker. 200 ml LB-Medium werden mit 5 ml E. Coli W3110 [λ CI¹⁸ Sam7] über Nacht-Kultur angeimpft und bei 30°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen bis etwa 4 x 10⁸ Zellen/ml (A₆₀₀ = 0,5; 2-3 h). Ein Thermometer wurde in den Kolben

eingbracht und der Kolben in einem 60°C Wasserbad rasch auf 45°C erhitzt und 10 min bei dieser Temperatur belassen (thermische Induktion). Anschließend wurden die Zellen pelletiert (GSA, 7000 rpm, 10 min, 4°C) und in 5-10 ml SM suspendiert. 1/40 Vol. CHCl_3 und 200 µg/ml Lysozym wurden zugefügt zur Lyse der E.Coli Zellen. Bakterielle DNA/RNA wurde durch Zugabe von DNase I und RNase A (je 1 µg/ml) verdaut (1 h, 37°C). Die Phagen wurden pelletiert (HB4, 10000 rpm, 10 min) und die DNA isoliert wie oben (6.2.1.5) beschrieben.

6.2.1.7 Präparation von M13-DNA (144)

M13-Plaques wurden ausgestochen mit gelben Gilsonspitzen, in 1 ml SM {100 mM NaCl + 50 mM Tris/HCl + 8 mM MgSO_4 } überführt, geschüttelt ("vortex"), anschließend bei 4°C gelagert. Eine einzelne Kolonie E. Coli JM103 wurde von einer M9-Agarplatte (siehe 6.1.1) in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 50 µl JM103 wurden zusammen mit 100 µl der Phagensuspension in 5 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dem Lysat wurde 1,5 ml abgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt, sodann 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben, in das 150 µl PEG-Lösung {20 % PEG 6000 + 2,5 M NaCl} vorgelegt war. Die Lösungen wurden gemischt ("vortex") und 30 min bei 0°C inkubiert. M13-Phagen wurden ausgefällt durch Zentrifugation (10 min, RT) und in 100 µl TE {10 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA} aufgenommen. Nach Phenol/ CHCl_3 - und CHCl_3 -Extraktion (je 1 x) wurde die DNA ethanolgefällt, gewaschen, getrocknet und das (unsichtbare) Pellet in 20 µl TE gelöst. 1-2 µl wurde analysiert auf einem 0,5 % Agarosegel (siehe 6.2.2.3). Zur Sequenzierung (siehe 6.2.2.4.1) wurde die gleiche Menge eingesetzt.

6.2.1.8 Elution von DNA aus Agarosegelen

6.2.1.8.1 Extraktion aus niedrig-schmelzenden Gelen (140-142)

Niedrig schmelzende Agarose (Sigma) wurde in TBE-Elektrophorese Puffer {89 mM Tris/Borat + 2 mM EDTA (pH 8,0)} aufgeköcht, auf 50°C abgekühlt, Ethidiumbromid hinzugefügt (0,5 µg/ml), und bei 4°C gegossen. Geschnittene DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Bande von Interesse unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten. Die Bande wurde bei 65°C geschmolzen, das Volumen bestimmt, sodann 5 Vol. 20 mM Tris/HCl pH 8,0 + 1 mM EDTA zugegeben und 1-2 x mit Phenol (ohne CHCl_3) extrahiert. Darauf folgte Extraktion mit Phenol/ CHCl_3 . Phenolreste wurden entfernt durch CHCl_3 -Extraktion der wäßrigen Phase (2 x), die Lösung gegebenenfalls eingeeengt durch mehrfache Extraktion mit 2-Butanol und die DNA ethanolgefällt.

6.2.1.8.2 Elektroelution

Alternativ wurden DNA-Fragmente durch Elektroelution aus normalen Agarosegelen (siehe 6.2.2.1) isoliert. Für kleine Gelstücke wurde das BIOMETRA-Verfahren (BIOMETRA, Göttingen, Best. Nr. E 051) angewandt. Hierbei wird die DNA in eine Hochsalzlösung (3 M Na-Acetat) hineinelektrophoriert (100 V, 30-60 min) und ethanolgefällt. Keine Phenolextraktion ist hier erforderlich, weiterhin kommt das System ohne Membranen aus. Für Einzelheiten der Methode sei auf die Herstellerangaben (BIOMETRA). DNA aus größeren Mengen an Gelstücken (> 1 ml), oder stark verdünnte Lösungen oder synthetische Oligonukleotide, die schlecht mit Ethanol zu fällen sind, wurde das BIOTRAP 2000 System (Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Hierbei wird die Nukleinsäure zwischen zwei Membranen eingefangen und konzentriert. Die Dauer beträgt etwa 2 h bei 200 V. Für Einzelheiten sei auf die Instruk-

tionen von Schleicher & Schuell verwiesen.

6.2.1.8.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration wurde bei kleinen Mengen an DNA (wenige μg) abgeschätzt durch Vergleich eines Aliquots auf einem Agarosegel mit bekannten DNA-Mengen. Bei größeren Mengen an DNA wurde die Konzentration über eine Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) bestimmt. Es wurde verwendet: 1 A_{260} -Einheit $\hat{=}$ 50 μg DNA. Die Reinheit des Präparats wurde abgeschätzt durch eine Messung der Absorption bei 280 nm (A_{280}). Bei protein-freien Nukleinsäurelösungen liegt ein Verhältnis von A_{260}/A_{280} von etwa 2,0 vor (140).

6.2.2 Analyse und Manipulation von DNA (140-142)

6.2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Agarose Typ II (Sigma) (0,5-1,2 %, w/v) wurde in 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris/Borat + 2 mM EDTA) im Mikrowellenherd 10 min gekocht, dann auf 50°C abgekühlt und 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid zugefügt. Die gleiche Konzentration an Ethidiumbromid wurde in den Lauffuffer gegeben. Für analytische Minigele wurde 8 ml Agarose von 50°C auf einer 5x7 cm Glasplatte mit Geltaschenformer (Pharmacia) vorsichtig gegossen. Auf solchen Gelen konnte bis zu 1 ng DNA wahrgenommen werden. Für größere Gele wurde das Gelkammersystem GNA-200 (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6 x Gelladepuffer {6 x TBE + 30 % Glycerin + 0,025 % Bromphenolblau + 0,025 % Xylene Cyanol} versetzt, gemischt, 2 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel geladen. Die Spannung betrug 50 V am Start und wurde nach 1-10 min auf 100 V erhöht (3-5 h). Gelläufe über Nacht wurden mit 35 V durchgeführt.

6.2.2.2 Restriktionen

Im Standardansatz wurde 1 μg DNA mit der entsprechenden Anzahl Enzymeinheiten 0,5 - 1 h bei 37°C in 50 μl Reaktionsvolumen verdaut. Wo immer möglich, wurde der Originalpuffer (Boehringer Mannheim) verwendet. Zur Erstellung von Restriktionskarten wurde zuerst mit nur einem Enzym geschnitten, auf einem Agarosegel analysiert, dann der Puffer gegebenenfalls adjustiert und mit einem zweiten Restriktionsenzym nachverdaut.

6.2.2.3 Ligationen

1 μg Vektor-DNA wurde geschnitten mit dem gewünschten Restriktionsenzym, dann Phenol/ CHCl_3 - und CHCl_3 -extrahiert (je 2x), schließlich ethanolgefällt, gewaschen, getrocknet und in 100 μl TE {10 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 1 mM EDTA} gelöst. Somit ergab sich eine Konzentration an geschnittenem Vektor von etwa 6 ng/ μl . Die zu klonierende DNA wurde verdaut mit Restriktionsenzym eventuell durch präparative Gelelektrophorese gereinigt, ansonsten behandelt wie die Vektor-DNA. Etwa 10-100 ng isoliertes DNA-Fragment (oder Restriktionsgemisch verschiedener Fragmente) wurde mit 1-6 ng Vektor gemischt und auf 12 μl mit H_2O aufgefüllt. Die Ansätze wurden 2 min bei 65°C inkubiert, 30 min bei RT stehengelassen, 5 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Dann wurden 4 μl als Kontrolle entnommen und bei -20°C gelagert. Zu den verbleibenden 8 μl Ligationsansatz wurde 1 μl 10 x Ligasepuffer {200 mM Tris/HCl + 100 mM MgCl_2 + 10 mM DTT + 0,6 mM ATP (pH 7,6)} und 0,5-1 μl T4-DNA-Ligase gegeben, gemischt, und über Nacht bei 16°C

inkubiert. Sodann wurden wieder 4 µl entnommen und auf einem dünnen, 1 % Agarose-Minigel mit der Kontrolle verglichen. Eine Veränderung des Bandenmusters mit Shift nach höherem Molekulargewicht zeigte eine erfolgreiche Ligation an. 1-2 µl Ligationsgemisch wurde sodann zur Transformation in E. Coli (siehe 6.1.2) verwendet.

6.2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte nach dem Prinzip von Sanger (150). Es wurde entweder mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I entsprechend (144) mit $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{dATP}$ (800 Ci/mmol) oder mit dem Sequenase-Kit (151) der Firma Renner (Dannstadt) und $\{\alpha\text{-}^{32}\text{S}\}\text{dATP}$ (1200 Ci/mmol) gearbeitet, entsprechend den Herstellerangaben.

6.2.2.4.1 M13-DNA

Einzelsträngige DNA wurde wie in 6.2.1.7 beschrieben isoliert. 1/5 bis 1/20 der erhaltenen DNA wurde mit 0,5 pmol Oligonukleotidprimer 15 min bei 37°C inkubiert, dann auf Eis gekühlt. Die weiteren Reaktionen wurden gemäß (144) (Klenow) oder Herstellerangaben (Sequenase) durchgeführt.

6.2.2.4.2 Doppelstrang-DNA

Plasmid-DNA wurde wie oben beschrieben (6.2.1.3) isoliert und über wenigstens einen CsCl-Dichtegradienten gereinigt. Plasmide wurden alkalisch denaturiert (152,153). Hierzu wurde zu 2 µg Plasmid in 40-100 µl 1/10 Vol. 0,2 M NaOH gegeben und 5 min bei RT stengelassen. Neutralisation erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens 2 M NH_4OAc (pH 4,5) auf Eis. 3 Vol. absoluten Ethanol (-20°C) wurde zugegeben, gemischt, 5 min bei -70°C inkubiert, sodann 10 min bei 4°C zentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit 1 ml 70 % Ethanol (0°C), anschließend wurde die DNA im Ölpumpenvakuum kurz getrocknet. Zum Pellet wurde 2 µl 5 x Sequenasepuffer {200 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 100 mM MgCl_2 + 250 mM NaCl}, 7 µl H_2O und 1 µl Oligonukleotid (0,5 pmol) gegeben, gemischt, und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und 0,6 µg E.Coli SSB-Protein (Pharmacia) zugefügt. Die weiteren Reaktionen waren entsprechend der Sequenase-Vorschrift (USB). Vor der Elektrophorese wurde eine Protease K-Verdauung (10 ng/µl, 60°C, 20 min) in einer feuchten Kammer durchgeführt.

6.2.2.4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Je 1000 ml Acrylamidlösung (4 % Acrylamid + 0,2 % Bisacrylamid + 7 M Harnstoff + 1 x TBE) wurde sterilfiltriert (Millipore 0,2 µm-Filter) und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Zur Sequenzierung wurden 100 ml abgefüllt, 50 mg Ammoniumpersulfat (Biorad) zugefügt, kurz entgast und die Polymerisation durch Zugabe von 40-50 µl TEMED gestartet. Mit diesen Konzentrationen an Startersubstanzen erfolgt nach etwa 10 min die Polymerisation im Becherglas. Das MACROPHOR 2010 Elektrophoresesystem wurde zur Sequenzierung verwendet (LKB, Gräefeling). 20-40 µl Bind-Silan (LKB, Gräefeling) wurden gleichmäßig auf der "Ohren"-Platte verteilt, mit etwas absolutem Ethanol nachgerieben und 5 min stengelassen. Überschüssiges Bind-Silan wurde durch 5 x Waschen der Glasplatte mit absolutem Ethanol entfernt. Die Thermostat-Platte wurde mit 100-200 µl Repel-Silan (LKB, Gräefeling) behandelt. Spacer 0,1 mm und 0,2 mm wurden so aufgelegt und befestigt, daß ein Dicke-Gradient entstand mit 0,1 mm am Start und 0,5 mm am Ende des Gels (153). Die "Ohren"-Platte wurde aufgelegt und das Gel in "Schiebe-Technik" gegossen, und ein durchge-

hender Kamm (0,1 mm) wurde 2-3 mm tief eingefügt. Nach 30 min Polymerisationsdauer wurde der Kamm entfernt und die Geloberfläche mit Wasser ausgespült. Das Gel wurde dann in die Macrophorapparatur eingebaut und 1-16 h polymerisieren gelassen. Ein sogenannter Vorlauf des Gels (23-24 mA konstant, 10-30 min) wurde durchgeführt und das Gel auf 50°C aufgeheizt. Dann wurde ein "Haifischzahn"-Kamm eingefügt. Die Proben wurden denaturiert (75-80°C, 2 min), dann abgekühlt, die Geloberfläche ausgiebig mit Puffer gespült und etwa 1 µl Probe wurde mit einer 0,2 mm/10 µl Hamiltonspritze aufgetragen. Um ein Diffundieren der Proben zu vermeiden, wurde immer nur ein Ansatz (AGCT) aufgetragen und etwa 2 min Spannung angelegt vor dem Auftragen des nächsten Ansatzes. Jedesmal wurde die Geloberfläche mit Puffer neu gespült, um austretenden Harnstoff zu entfernen. Das Gel wurde während des Laufs (23-24 mA konst., 2000-2500 V, 2 h) auf konstant 50°C gehalten. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel 35 min in 2 l 10 % Essigsäure unter leichtem Schütteln inkubiert (Entfernung des Harnstoffs), sodann 1 h bei 100°C getrocknet. Röntgenfilm (Kodak XAR5 oder Cronex) wurde direkt auf das Gel aufgelegt und 1-14 Tage bei RT exponiert.

6.2.2.4.4 Computerauswertung

Ermittelte DNA-Sequenzen wurden mit MICROGENIE 4.0 oder 5.0 (Beckmann) oder mit dem Programm der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWCGC) (Version 5.3) aneinandergesetzt. Proteindaten (isoelektrische Punkte, Novotny-Analysen) wurden mit dem PCGENE Programm (Version 5.1) berechnet.

6.2.3 Synthetische Oligonukleotide (154-156)

6.2.3.1 Synthese

Synthetische Oligodesoxynukleotide wurden entweder auf Applied Biosystems oder Biosearch 8600 DNA-Synthesizer nach der Festphasen-Phosphoramidit-Methode (164) auf 0,25 oder 1,0 µmol-Säulen synthetisiert und standen als Säule zur Verfügung.

6.2.3.2 Deprotektion und Abspaltung von der Säule

Alle Oligonukleotide standen nicht-trityliert zur Verfügung. Zur Abspaltung des Oligonukleotids von dem Säulenmaterial wurde die Säule mit einem Skalpell geöffnet und das Säulenmaterial mit etwa 1 ml 35 % Ammoniaklösung in ein fest verschließbares 2 ml Gefäß gespült. Sodann wurde über Nacht bei 50°C (oder 2 h, 75°C) inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt, und der Überstand vom Säulenmaterial abdekantiert, kurz zentrifugiert, anschließend lyophilisiert und in TE aufgenommen. Die Menge an Oligonukleotid wurde bestimmt durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}). Es wurde verwendet: 1 $A_{260} \hat{=}$ 33 µg Oligonukleotid. Typische Ausbeuten betrugen 20 A_{260} -Einheiten bei Verwendung einer 0,25 µmol-Säule oder 80 Einheiten bei einer 1,0 µmol-Säule.

6.2.3.3 Präparative Gelelektrophorese

Gegebenenfalls mußten die synthetisierten Oligonukleotide von kürzerkettigen Bestandteilen gereinigt werden. Hierzu wurde die der Geltaschengröße entsprechende Menge an Oligonukleotid-Rohgemisch (0,3-0,4 A_{260} -Einheiten/mm²) lyophilisiert und in 20-40 µl entionisiertem Formamid gelöst. Ein etwa 40 cm langes 18 % Acrylamidgel wurde hergestellt (18 %

Acrylamid/Bisacrylamid = 40:2, 7 M Harnstoff, 1 x TBE), die Proben aufgetragen und elektrophoriert, bis Bromphenolblau etwa 2/3 der Wegstrecke zurückgelegt hatte. Bromphenolblau in Formamid (0,025 %) wurde als Marker in benachbarte Geltaschen aufgetragen. Die Produktbande wurde detektiert durch "UV-Shadowing". Hierzu wurden F₂₅₄-DC-Platten (Merck) mit Klarsichtfolie abgedeckt, und hierauf das Polyacrylamidgel gelegt. Sodann wurde von oben mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Die Oligonukleotide erschienen als dunkle Banden, da ihre aromatischen Ringsysteme UV dieser Wellenlänge absorbieren. Die größte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mit dem BIOTRAP-Gerät von Schleicher & Schuell (Dassel) elektroeluiert. Von 15 aufgetragenen A₂₆₀-Einheiten wurden etwa 6-8 Einheiten des gereinigten Oligonukleotids erhalten.

6.2.3.4 Analyse von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden kinasiert (165) und auf 18 % Acrylamid/7 M Harnstoff-Minigelen (8 x 9 x 0,2 cm) analysiert. In einem typischen Kinasierungsansatz (10 µl) wurden > 10 pmol Oligonukleotid mit < 1 pmol { γ -³²P}ATP (7000 Ci/mmol) und 1 unit T4-Polynukleotidkinase in 1 x Kinasepuffer {50 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl₂ + 5 mM DTT} 30 min bei 37°C inkubiert. 4 µl Formamidprobenpuffer {Entioniertes Formamid + 0,025 % Bromphenolblau} wurde zugegeben und 1 µl hiervon auf dem Acrylamidgel aufgetrennt (400 V, 20 min). Anschließend wurde das Gel in 10 % Essigsäure + 2 % Glycerin 15 min belassen, sodann getrocknet (80°C, 30 min) und autoradiographiert. Nach 10 min (RT) waren bereits Banden zu erkennen. Belichtung über Nacht (RT) zeigte Abbaubanden an.

6.2.4 Präparation von ³²P-markierter DNA

6.2.4.1 Markierung von Oligonukleotiden (157)

Oligonukleotide wurden markiert durch Transfers einer ³²PO₄-Gruppe von { γ -³²P}ATP auf die freie 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose. Hierbei wurde das { γ -³²P}ATP in etwa doppeltem molarem Überschuß eingesetzt. In einem typischen Ansatz wurden 5-7 pmol Oligonukleotid mit 14 pmol { γ -³²P}ATP (6000 Ci/mmol) und 10 units T4-Polynukleotidkinase 1-2 h bei 37°C in 1 x Kinasepuffer {50 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl₂ + 5 mM DTT} inkubiert. Das noch vorhandene freie ATP wurde mit einer kleinen DE52-Säule abgetrennt. Hierzu wurde eine blaue Gilsonspitze mit etwas silikonisierter Glaswolle abgedichtet, sodann etwa 100 µl Säulenmaterial, äquilibriert in TE + 0,2 M NaCl, eingefüllt und mit dem gleichen Puffer gewaschen. Der Kinasierungsansatz wurde direkt auf die Säulenmatrix gegeben und mit 1 ml TE + 0,2 M NaCl gewaschen. Anschließend wurde das kinasierte Oligonukleotid mit 0,5 ml TE + 1 M NaCl eluiert. Ein Aliquot von 1 µl wurde nach der Methode von Cerenkov (158) im ³H-Kanal eines Szintillationszählers (Zinsser Analytic oder Beckman 1801) gemessen. Die spezifische Aktivität des Oligonukleotids hing von der Länge und Sequenz ab. Typischerweise wurden 1-3 x 10⁶ cpm/pmol Oligonukleotid erzielt.

6.2.4.2 Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Restriktionsfragmente wurden mit der sogenannten "Random-Priming" Methode (159) markiert. { α -³²P}dCTP (3000 Ci/mmol) wurde an denaturierter "Template"-DNA mit statistischen Hexaoligonukleotiden in neue DNA-Stränge eingebaut. Da kein DNA-Abbau stattfindet, wie bei der herkömmlichen "Nick-Translation" lag die spezifische Aktivität der DNA routinemäßig bei > 10⁹

cpm/ μ g DNA. Dieser Wert liegt etwa um einen Faktor 10 höher als die bei der Nick-Translation erreichbare spezifische Aktivität (140). In dieser Arbeit wurde der Labeling-Kit von Amersham PRM 1601 zur radioaktiven Markierung von DNA eingesetzt und genau nach der Vorschrift gearbeitet, mit der Ausnahme, daß 2 units Klenow-Enzym eingesetzt wurden (siehe Herstellerinformation). Zur Beendigung der Reaktion wurde zu 50 μ l Reaktionsvolumen 5 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 10 μ g Hefe-tRNA zugesetzt. Die markierte DNA wurde von nichtinkorporierten Nukleotiden durch Sephadex G-50 Chromatographie abgetrennt. Hierzu wurde etwas silikonisierte Glaswolle in eine sterile 1 ml-Spritze gegeben, deren Öffnung auf etwa Nadeldurchmesser verkleinert worden war. Sephadex G-50 (medium) in TEN {10 mM Tris/HCl pH 7,4 + 1 mM EDTA + 6 mM NaCl} wurde in die Spritze gefüllt und ablaufen gelassen. Sodann wurde die Spritze in ein 10 ml-Greiner Zentrifugationsgefäß gegeben und 5 min bei 2000 rpm JS13.1-Rotor (HB-4) zentrifugiert. Der Markierungsansatz wurde auf die Säulenmatrix pipettiert und das Reaktionsgefäß mit 100 μ l TEN nachgewaschen. Es erfolgte eine zweite Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen, mit der Ausnahme, daß ein 1,5 ml Eppendorfgefäß ohne Deckel auf den Boden des 10 ml-Zentrifugationsgefäßes gegeben worden war. Die markierte DNA wurde so in das Eppendorfgefäß zentrifugiert. Ein 1 μ l-Aliquot wurde wie oben (6.2.4.1) beschrieben nach Cerenkov vermessen.

6.2.5 Southern-Analyse (140-142,160,161)

6.2.5.1 Diffusionstransfer

DNA-Proben wurden auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt, und das Gel mit einem Zentimetermaß photographiert. Die im Gel enthaltene DNA wurde durch Inkubation des Gels in 0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl denaturiert (1 h, RT), anschließend mit 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5) + 1,5 M NaCl neutralisiert. Das Gel wurde auf zwei Lagen Whatman 3mm Papier gelegt. Eine markierte Nylonmembran (Amersham Hybond N) wurde auf das Gel aufgelegt, so daß die DNA möglichst nahe der Folie zu liegen kam. Zwei Lagen 3mm Papier wurden auf die Membran gelegt. Schwammtücher wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, in einer Schale gestapelt, dann das Gel mit Membran und 3mm Papier aufgelegt, hierauf wieder zurechtgeschnittene Schwammtücher. Sodann wurde 20 x SSC (0,3 M Na-Citrat pH 6,8 + 3 M NaCl) in die Schale gefüllt. Der Puffer stieg dann durch das Gel, dann durch die Hybond-Membran und transferierte die DNA vom Gel auf die Membran. Die Anordnung wurde über Nacht stehengelassen, dann die Membran entnommen, an der Luft getrocknet, und nach Herstellerangaben 2 min mit der DNA nach unten auf ein 302 nm UV-Sichtgerät gelegt. Hierbei erfolgt eine kovalente Quervernetzung von DNA mit der Membran (Amersham, Produktinformation). Sodann konnte die Membran vorhybridisiert werden (siehe unten). Das verbleibende Agarosegel wurde mit Ethidiumbromidlösung (0,5 μ g/ml) gefärbt, um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen.

6.2.5.2 Vakuumtransfer (162)

Mit dieser kürzlich entwickelten Methode kann der Diffusionstransfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembran in etwa 1 h durchgeführt werden. Das Gel wird präpariert wie oben beschrieben, das Gel aber auf die Nylonmembran gelegt. Gel und Membran werden auf zwei Lagen 3mm Papier auf einen Vakuumgeltrockner gelegt. Die noch freie Trocknungsfläche wird mit Parafilm abgedichtet. Auf das Gel werden 2 Lagen 3mm Papier, sodann mit 20 x SSC {0,3 M Na-Citrat pH 6,8 + 3 M NaCl} getränkte Papierhandtücher gelegt. Vakuum wird angelegt für 30-60 min, hierbei Puffer auf die Papierhandtücher nachgeschüttet. Das Vakuum saugt den Puffer durch Gel und Membran. Die DNA

wird dabei auf die Membran transferiert. Die Membran wurde dann luftgetrocknet, und die DNA wie oben beschrieben (6.2.5.1) UV-quervernetzt.

6.2.5.3 Hybridisierung mit Oligonukleotiden in situ (163)

Diese Methode der Oligonukleotid-Hybridisierung ist etwa 5 x sensibler als die Southern-Methode (58,163). Das Agarosegel wurde denaturiert und neutralisiert (siehe 6.2.5.1), anschließend auf zwei Lagen 3mm Papier gelegt, mit Klarsichtfolie bedeckt und auf einem Gelrockner getrocknet (60°C, 1h, dann 30 min, RT). Das getrocknete Gel wurde in aqua bidest. vom 3mm Papier befreit, sodann vorhybridisiert. Das klare Gel wurde in reichlich Oligonukleotid-Hybridisierungspuffer {6 x SSC + 0,1 % SDS + 10 mg/ml HefetrRNA + 10 x Denhardt's Lösung} ohne Schütteln 2-16 h bei 65°C inkubiert. 10 x Denhardt's Lösung ist 0,2 % Ficoll 400 + 0,2 % Polyvinylpyrrolidon + 0,2 % BSA (alle w/v) (164). Anschließend wurde die Lösung abgegossen und das Gel in eine Plastiktüte eingeschweißt. In die Tüte wurde 1-3 x 10⁶ cpm/ml 5'-markiertes Oligonukleotid im Oligonukleotidhybridisierungspuffer gegeben, diese sodann verschlossen und 2-16 h bei Temperaturen von 5-10°C unter dem T_m-Wert des Oligonukleotides inkubiert. Der T_m-Wert für Oligonukleotide von 15-17 Nukleotiden wurde nach Thein und Wallace (58) berechnet: T_m = 4°C x $\sum(G+C)$ + 2°C x $\sum(A+T)$. Für das 24mer Oligonukleotid A1,301 galt 60°C = stringent (nur perfekte Basenpaarung möglich); 45°C = nichtstringent (nicht alle Basen stimmten überein). Anschließend erfolgte Waschen des hybridisierten Gel. Hierzu wurde 2 x 1 min mit 6 x SSC + 0,1 % SDS bei RT gewaschen, dann 2-3 x 10 min bei Hybridisierungstemperatur. Die Waschlösung wies dann < 20 ips (Handmonitor) auf. Das gewaschene Gel wurde zwischen Klarsichtfolie fixiert und bei -70°C mit einer Verstärkerfolie autoradiographiert.

6.2.5.4 Hybridisierung mit Fragmenten (140-142,161)

Die Membran mit quervernetzter DNA wurde vorhybridisiert in reichlich Fragment-Hybridisierungslösung {6 x SSC + 0,1 % SDS + 10 x Denhardt's Lösung (0,2 % Ficoll 400 + 0,2 % Polyvinylpyrrolidon + 0,2 % BSA (alle w/v)) + 0,35 % N-Laurylsarkosyl (w/v)} (142) für 4 - 16 h bei 65°C unter leichtem Schütteln. Die Lösung wurde entfernt und die Membran in eine Plastiktüte eingeschweißt. 1-3 x 10⁶ cpm ³²P-markierte DNA wurden denaturiert im kochenden Wasserbad, kurz gekühlt, und zur Membran gegeben. Die Tüte wurde verschlossen, in eine zweite Tüte eingeschweißt und dann über Nacht bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die radioaktive Lösung entfernt und die Membran mit 1 x SSC + 0,1 % SDS (65°C) für 1 x 1 min, 1 x 10 min, und 1 x 60 min gewaschen. Ließ sich noch Radioaktivität in der Waschlösung nachweisen (> 20 ips), wurde noch ein Waschschrift von 30-60 min angeschlossen. Diese Waschprozedur reichte im allgemeinen aus, um unspezifische Hybridisierung von nichthomologen DNA-Strängen weitgehend zu entfernen. Ein Waschschrift mit 0,1 x SSC + 0,1 % SDS (1 h, 65°C) wurde durchgeführt, wenn hohe Stringenz beabsichtigt war. Die gewaschene Membran wurde in feuchtem Zustand zwischen Klarsichtfolie fixiert und autoradiographiert für 1 h bis 7 Tage bei -70°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Dupont).

6.2.6 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Die Experimente wurden nach Herstellerangaben (Perkin-Elmer, Offenbach) mit DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) durchgeführt. Individuelle Abweichungen sind in den einzelnen Figuren gegeben. Phagen-DNA oder 2 µg genomische DNA wurde in Gegenwart von 0,2 mM dNTPs (= dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,03 - 1,0 µM Oligonukleotid-Primer im

Taq-Puffer {25 mM TAPS/Cl (pH 9,3) + 50 mM KCl + 2 mM MgCl₂ + 1 mM DTT} und 2,5 units Taq-Polymerase (0,5 µl) denaturiert (94°C, 10 min). Um die Verdampfung zu begrenzen, wurde die wäßrige Phase mit 100 µl Paraffinöl überschichtet. Sodann folgten 25-35 Zyklen nach folgendem Muster: "Annealing" (37-42°C, 2 min) - Reaktion (70°C, 3-4 min) - Denaturierung (94°C, 1 min). Diese Reaktionen wurden manuell in Wasserbädern mit 0,75 ml Eppendorf-Gefäßen oder im Perkin-Elmer Thermal-Cycler Gerät (File #4) durchgeführt. Die untere, wäßrige Phase wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 1 x mit 1 ml wassergesättigtem Diethylether extrahiert, sodann ethanolgefällt, getrocknet und für Agarosegelelektrophorese in 10 µl 1 x Gelladepuffer {1 x TBE + 5 % Glycerin + Bromphenolblau / Xylene Cyanol} aufgelöst.

6.2.7 Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten

Einzelne PCR-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, 1 ml TE zugefügt, zweimal eingefroren und aufgetaut. Nach heftigem Schütteln ("vortex") wurden Agarosefragmente pelletiert (16000 x g), und 20 µl für 35 weitere PCR-Zyklen wie oben beschrieben eingesetzt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit präparativer Agarosegelelektrophorese (ein- bis zweimal) von überschüssigen Oligonukleotiden befreit. 0,5 pmol Produkt wurde in 1 x Sequenasepuffer (siehe oben) in Gegenwart von 5 pmol Oligonukleotidprimer 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert. Die Sequenzierung wurde sofort gestartet durch Zugabe von 6,5 µl fertigen Mixes (1 µl 0,1 M DTT plus 0,5 µl [α^{32} S]dATP (1200 Ci/mmol) plus 2 µl 1 x Labeling-Mix plus 2 µl Sequenase (1:8). Im weiteren wurde wie bei einer normalen Sequenzierung (siehe oben) verfahren.

6.3 R N A

6.3.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

6.3.1.1 Gesamt-Cytoplasma-RNA (165)

4 x 10⁶ HeLa S3 Zellen in Rührkultur (4 x 10⁶ Zellen/ml) wurden gesammelt durch Zentrifugation (GSA, 3000 rpm, 4°C, 10 min) und einmal mit 250 ml kaltem PBS {137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 1,5 mM KH₂PO₄ + 8 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0)} gewaschen. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette in 2 ml kaltem PBS suspendiert und in zwei 30 ml Corex-Gläser gegeben, sodann auf 30 ml mit PBS auf Eis aufgefüllt, dann wieder pelletiert (HB-4, 1000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, und 1 ml Lysispuffer {10 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 1,5 mM MgCl₂ + 140 mM NaCl + 10 mM Vanadylribosid-Komplex + 0,5 % NP40} auf das Zellpellet gegeben. Sodann wurde 1-3 sec gemischt ("Vortex"), dann mit kaltem Lysispuffer auf 11 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde mit kaltem Lysispuffer + 24 % Saccharose unterschichtet, sodann 20 min im HB-4 Rotor bei 8000 rpm (10000 x g) und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein 150 ml-Corex-Glas überführt, ein Volumen 2 x Proteinase K-Puffer {0,2 M Tris/HCl + 0,3 M NaCl + 25 mM EDTA + 2 % SDS} sowie 200 µg/ml Proteinase K zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Sodann wurde 1/20 Vol. 8 M LiCl und 2,5 Vol. kalten Ethanol zugefügt, und zentrifugiert (GSA, 5000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz getrocknet, sodann in 1 % SDS gelöst und 2 x Phenol/CHCl₃- und 2 x CHCl₃-extrahiert. Die RNA wurde ethanolgefällt wie oben, getrocknet und in 0,1 % SDS gelöst. Die Ausbeute und Reinheit wurde bestimmt durch Messung von der Absorption bei 260 nm (A₂₆₀). Es wurde

verwendet: 1 A₂₆₀ = 40 µg/ml RNA; Bei proteinfreien Präparaten liegt das Verhältnis von A₂₆₀/A₂₈₀ bei etwa 2,0 (140). Die Ausbeute dieser Methode lag bei durchschnittlich 1,5 mg RNA/10⁸ HeLa-Zellen mit A₂₆₀/A₂₈₀ von nahe 2,0.

6.3.1.2 Poly(A⁺)-RNA

Die Isolierung von poly(A⁺)-RNA aus cytoplasmatischer RNA erfolgte durch Oligo(dT)-Cellulose Chromatographie, wie original bei Aviv und Leder (166) beschrieben. Etwa 0,3 ml Oligo(dT)-Cellulose wurde in eine 2 ml Spritze gefüllt, die vorher mit etwa silikonisierter Glaswolle abgedichtet worden war. An die Säule wurde eine peristaltische Pumpe und ein Absorptionsmeßgerät mit Durchflußküvette (LKB) angeschlossen. Die Säule wurde mit 10-20 Säulenvolumen autoklaviertem aqua bidest., darauf mit dem gleichen Volumen 0,2 M NaOH, und wieder mit sterilem aqua bidest. gewaschen, bis der pH des Eluat etwa neutral war. Sodann wurde die Säule mit 10-20 Säulenvolumen Bindepuffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 10 mM EDTA + 500 mM NaCl] äquilibriert. Die RNA (in 0,1 % SDS-Lösung) wurde auf diesen Puffer eingestellt mit 2 x Bindepuffer, 5 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, und auf die Säule gegeben, dann mit 10-20 Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Die poly(A⁺)-RNA wurde aufgefangen, erneut auf 65°C erhitzt und auf die Säule gegeben, dann noch einmal mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Poly(A⁺)-RNA wurde eluiert mit Elutionspuffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 10 mM EDTA + 0,1 % SDS]. Je nach Bedarf wurde die poly(A⁺)-RNA auf 65°C erhitzt und noch einmal über die Säule geschickt, um Reste von poly(A⁻)-RNA abzutrennen. 1/10 Vol. 8 M LiCl und 3 Vol. kaltes Ethanol wurde zugegeben und die RNA ethanolgefällt (HB4, 10000 rpm, 30 min, 0°C). Die RNA wurde in 0,1 % SDS gelöst und aliquotiert bei -20°C gelagert.

6.3.2 Gelelektrophorese von RNA

6.3.2.1 Methylquecksilber-Agarosegele (167)

100 ml 1,2 % Agarose in Elektrophoresepuffer {50 mM Borsäure + 5 mM Na-Borat + 10 mM Na₂SO₄ + 1 mM EDTA} wurden aufgekocht, dann auf 65°C abgekühlt. Anschließend wurde 1 ml 1 M CH₃HgOH zugegeben (Abzug) (Endkonzentration 10 mM) und die Agarose zu einem 18 x 17 x 0,1 cm Gel gegossen. Nach 30 min bei RT wurden die RNA-Proben mit einer Mikrokapillare in 2-8 µl Probenpuffer {0,5 x Elektrophoresepuffer + 10 % Glycerin + 10 % Ficoll + 0,2 % Bromphenolblau/Xylene Cyanol} in die Geltaschen des vertikalen Gels gefüllt und das Gel mit 60 V gestartet, dann auf 100 V erhöht. Der Lauf wurde gestoppt, nachdem Bromphenolblau etwa 2/3 der Wegstrecke zurückgelegt hatte (3,5-6 V/cm für 4-6 h). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (1 µg/ml in 0,5 M NH₄OAc) 30 min bei RT gefärbt und im UV-Licht (254 nm) photographiert.

6.3.2.2 Formamidgele (140-142)

1,5 g Agarose wurde mit 15 ml 10 x MOPS-Puffer {0,4 M 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (pH 7,0) + 50 mM NaOAc + 5 mM EDTA} und 110 ml aqua bidest. versetzt, und im Mikrowellenherd aufgekocht, dann auf 50°C abgekühlt. Sodann wurden 25 ml entionisiertes Formaldehyd (37 %), die auf 37°C erwärmt worden waren, zugegeben, gemischt und in eine Flachbettgießform (Pharmacia GNA-200) gegossen (Abzug). Die RNA-Proben wurden lyophilisiert und in 10 µl RNA-Probenpuffer [1 x MOPS-Puffer + 2,2 M Formaldehyd + 50 % Formamid + 0,025 % Bromphenolblau/Xylene Cyanol] aufgenommen. Die Proben wurden 5 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, und in die Geltaschen geladen. Der Lauf startete mit 50 V für 10 min und erfolgte dann bei 80-100 V für 5-7 h (RT). In dieser Zeit legte das Bromphenolblau etwa 2/3 der

Wegstrecke zurück. Die RNA-Molekulargewichtsmarker-"Lanes" wurden mit einem Skalpell abgetrennt und in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) für 1 h gefärbt, anschließend 1 h in destilliertem Wasser entfärbt und im UV-Licht photographiert.

6.3.3 Northern-Analyse von RNA (59,140-142)

RNA wurde auf MOPS/Formaldehyd-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 6.3.2.2) und anschließend auf Nylonmembranen (Amersham Hybond-N) transferiert. Hierzu wurde das Gel 3-5 x 2 min mit aqua bidest gewaschen, dann 1 h in 20 x SSC {0,3 M Na-Citrat (pH 6,8) + 3 M NaCl} inkubiert. Darauf wurde die RNA wie beim DNA-Diffusionstransfer (6.2.5.1) beschrieben mit der Southern-Methode auf die Membran übertragen. Die Vorhybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in 6 x SET {1 M NaCl + 6 mM EDTA + 66 mM Tris/HCl (pH 7,8)} + 10 x Denhardt's {0,2 % Ficoll 400 + 0,2 % Polyvinylpyrrolidon + 0,2 % BSA (alle w/v)} + 0,1 % SDS. Die Hybridisierung erfolgte im gleichen Puffer + 1-2 x 10⁶ cpm/ml ³²P-markiertem Oligonukleotid. Die Waschbedingungen waren analog denen der Southernanalyse (siehe 6.2.5.3). Das zweite verwendete Verfahren war die Trocknung des Agarosegels (58,163) mit anschließender Hybridisierung in situ. Die Bedingungen der Hybridisierung von RNA waren identisch mit denen der Southernanalyse mit synthetischen Oligonukleotiden.

6.3.4 Primer-Extensions Analyse (59,141)

Oligonukleotide wurde kinasiert und gereinigt von freiem { γ -³²P}ATP wie beschrieben (siehe 6.2.4.1), mit der Ausnahme, daß das markierte Oligonukleotid mit TE + 0,5 M NaCl von der DE52-Säule eluiert wurde. 5 µg poly(A')-RNA wurde zu etwa 200 µl Eluat gegeben und mit 2,5 Vol. kalten Ethanol gefällt, 1 x mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 28 µl TE gelöst. Dann wurden 10 µl 5 x M-MLV-Puffer {250 mM Tris/HCl (pH 8,3) + 375 mM KCl + 50 mM DTT + 15 mM MgCl₂ (BRL)}, 2,5 µl von jedem 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 0,5 µl BSA (10 mg/ml) gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgte Zugabe von 1 µl (200 units) M-MLV Reverse Transkriptase (BRL), Inkubation bei 37°C für 30 min, nochmalige Zugabe von 200 units Enzym mit anschließender Inkubation (37°C, 30 min). 150 µl kaltes Ethanol wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch präzipitiert, gewaschen mit 70 % Ethanol, kurz getrocknet und in 2 µl Formamidpuffer (siehe 6.2.2.4.3) + 1 µl H₂O gelöst. Die Probe wurde 2 min bei 80°C erhitzt, auf Eis gekühlt und auf einem Sequenzierungsgel mit einem Sequenzierungsansatz als Molekulargewichtsmarker (siehe 6.2.2.4) analysiert.

6.4 Zellkultur

6.4.1 HeLa-Zellen

HeLa S3-Zellen wurden für RNA-Präparationen in Suspensionskultur gehalten (2-3 x 10⁵ Zellen/ml). Zwei Medien wurden verwendet. Zum einen MEM (Minimal Essential Medium, Gibco Nr. 072-1300 P) plus 0,2 % NaHCO₃ plus 0,45 % Glucose + 2 mM Hepes/NaOH (pH 7,4) plus 5-10 % Newborn Calf Serum (Gibco Nr. 021-06010 M), zum anderen DMEM/Nutmix F12 (Coon's Modification) (Gibco Nr. 041-9999 A) plus 2 mM Glutamin plus 63 µg/ml Penicillin-G plus 50 µg/ml Streptomycin plus 10-15 % FCS (Foetal Calf Serum, Gibco Nr. 011-06290 M) plus 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,2). Für Experimente mit anti-sense Oligo-

nukleotiden wurden HeLa-Zellen in Mikrotiterplatten in DMEM ohne F12 (Gibco Nr. 041-01965 M) plus 35 mM NaHCO₃ plus 2 mM Glutamin plus 63 µg/ml Penicillin-G plus 50 µg/ml Streptomycin plus 10 % FCS (hitzeinaktiviert, 1 h 56°C) gehalten und benutzt in subkonfluenten Dichten.

6.4.2 COS-Zellen

COS-Zellen (Green Monkey Kidney Cells) (74) wurden auf 9 cm Zellkulturplatten (Greiner) in DMEM/Nutmix F12 (Coon's Modification) (Gibco Nr. 041-9999 A) plus 2 mM Glutamin plus 63 µg/ml Penicillin-G plus 50 µg/ml Streptomycin plus 10-15 % FCS (Foetal Calf Serum, Gibco Nr. 011-06290 M) gehalten und benutzt in subkonfluenten Zelldichten.

6.4.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Ccc-Plasmid-DNA ("Supercoil") wurde über zwei CsCl-Gradienten gereinigt und mittels der Ca-Phosphat-Kopräzipitationsmethode (75) COS-Zellen eingebracht. 8 µg DNA (in TE) wurde mit 0,1 x TE {1 mM Tris/HCl (pH 7,4) + 0,1 mM EDTA auf 210 µl gebracht, 10 min bei 70°C inkubiert, abgekühlt auf RT und zentrifugiert. Es folgte Zugabe von 30 µl 2 M CaCl₂ (autoklaviert). Nach Mischen mit der Pipettenspitze wurden die Proben 5 min bei RT stehengelassen, sodann 240 µl 2 x HBS-Puffer/HCl {50 mM HEPES + 280 mM NaCl + 0,75 mM Na₂HPO₄ + 0,75 mM NaH₂PO₄ (pH 7,05)} + y mM HCl (siehe unten) zugegeben, mit der Pipettenspitze gemischt, und 15 min bei RT stehengelassen. Etwa 1 ml Medium wurde zugegeben und das Präzipitat in weitere 9 ml Medium in einer 9 cm Zellkulturplatte überführt. Diese wurde 1 h im Brutschrank inkubiert, anschließend das Präzipitat mikroskopisch untersucht. Eine richtige Größe der Kristalle ist wichtig für die Transfektion der Zellen. Eine gutes Präzipitat war feinkörnig, im Mikroskop gut zu erkennen, und verzeigte sich nicht. Dies wurde beeinflusst durch den pH des 2 x HBS und durch die DNA. Um besonders gute Präzipitate zu erhalten, wurden Testserien gemacht mit DNA/CaCl₂ und 2 x HBS-Lösungen mit verschiedenen pH-Werten. Hierzu wurde 2 x HBS (pH 7,05, autoklaviert) mit X µl 1 M HCl/ml versetzt (X = 1-24). Die Lösung wurde dann sterilfiltriert und konnte bei 4°C für Wochen gelagert werden, ohne das sich der pH verschob (gleiche Kristalle mit der gleichen DNA). Am nächsten Tag wurde ein DMSO-Schock durchgeführt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 25 % DMSO in TBS (37°C) 2 min bei 37°C behandelt, abgesaugt, anschließend zweimal mit Medium gewaschen und die Zellen in frischem Medium bei 37°C und 8 % CO₂ inkubiert.

6.4.4 Nachweis sekretierter Alkalischer Phosphatase (70)

Diese kürzlich entwickelte Methode benutzt eine sekretierte Form menschlicher, placentaler Alkalischer Phosphatase als Reportergen und stellt eine Alternative zum herkömmlichen CAT-Assay (Gorman et al. (125)) von Promotoren dar. 72 h nach Transfektion der pBC/Seap-Vektoren wurde auf Phosphataseaktivität getestet. 500 µl Zellüberstand wurde entnommen und 10 min bei 65°C inkubiert. Zellreste wurden abzentrifugiert (5 min, 14000 x g). 300 µl Überstand wurden entnommen und mit 300 µl 2 x Seap-Puffer {2 M Diethanolamin (pH 9,8) + 1 mM MgCl₂ + 20 mM L-Homoarginin} vermischt, und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 60 µl 120 mM p-Nitrophenylphosphat in 1 x Seap-Puffer (37°C) zugegeben, schnell gemischt und in eine 1 ml-Plastikküvette (Greiner) überführt. Sodann wurde die Absorption bei 405 nm (A₄₀₅) in einem DU20-Photometer (Beckman) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Als Nullwert diente Medium anstelle von Zellkulturüberstand. Zwischen den Messungen wurden die Küvetten bei 37°C gelagert.

HeLa S3-Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen in Mikrotiterplatten einen Tag vor dem Experiment angesiedelt. Das verwendete Medium enthielt hitzeinaktiviertes Serum (siehe oben). Jeweils 1 A₂₆₀-Einheit (33 µg) Oligodesoxynukleotid wurde dialysiert gegen aqua bidest., dann lyophilisiert und in 20 µl Medium gelöst. Hiervon wurden 5 µl zu den Zellen in 100 µl gegeben. Die Endkonzentration an Oligonukleotid betrug somit 10-12 µM. Die Zellen wurden anderntags im Phasenkontrast-Mikroskop (ZEISS IM) bei 125facher Vergrößerung untersucht und photographiert.

1. Abelson, J., (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48,1035-69.
2. Nevins, J.R., (1983). *Ann. Rev. Biochem.* 52,441-66.
3. Schröder, H.C., Bachmann, M., Messer, R. und Müller, W.E.G., (1985). *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 9,53-103.
4. Rhoads, R.E., (1985). *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 9,104-55.
5. Knowler, J.T., (1983). *Int. Rev. Cytol.* 84,103-153.
6. Holoubeck, V., (1983). In: *Chromosomal Nonhistone Proteins*. 4,21-217, (Hnilica, L.S., ed.), Boca Raton, Florida, CRC Press.
7. Dreyfuss, G., (1986). *Ann. Rev. Cell Biol.* 2,459-98.
8. Green, M.R., (1986). *Ann. Rev. Genet.* 20,671-708.
9. Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S. und Sharp, P.A. (1986). *Ann. Rev. Biochem.* 55,1119-150.
10. Leff, S.E., Rosenfeld, M.G. und Evans, R.M. (1986). *Ann. Rev. Biochem.* 55,1091-117.
11. Birnstiel, M.L., Busslinger, M. und Strub, K., (1985). *Cell* 41,349-59.
12. Webb, E.W., Schumm, D.E. und Palayoor, T. (1981). In: *The Cell Nucleus*. 2,199-248 (Busch, H., ed.), Academic Press NY.
13. Miller, O.L. Jr. und Hamkalo, B.A., (1972). *Int. Rev. Cytol.* 33,1-26.
14. Augenlicht, L.H. und Lipkin, M. (1976). *J. Biol. Chem.* 251,2592-99.
15. Beyer, A.L., Christensen, M.E., Walker, B.W. und LeStourgeon, W.M., (1977). *Cell* 11,127-38.
16. Beyer, A.L. und Miller, O.L.Jr., (1980). *Cell* 20,75-84.
17. Beyer, A.L., Bouton, A.H. und Miller, O.L. Jr. (1981). *Cell* 26,155-65.
18. Osheim, Y.N., Miller, O.L. Jr und Beyer, A.L., (1985). *Cell* 43,143-51.
19. Beyer, A.L. und Osheim, Y.N., (1988). (Eingereicht zur Veröffentlichung).
20. Samarina, O.P., Lukanidin, E.M., Molnar, J. und Georgiev, G.P., (1968). *J. Mol. Biol.* 33,251-63.
21. LeStourgeon, W.M., Lothstein, L., Walker, B.W. und Beyer, A.L., (1981). In: *The Cell Nucleus* 9,49-87 (Busch H., Ed.) Academic Press NY.
22. Samarina, O.P. und Krichevskaya, A.A., (1981). In: *The Cell Nucleus*. 9,1-48, (Busch, H., ed.) Academic Press NY.
23. Wilk, H.E., Angeli, G. und Schäfer, K.P., (1983). *Biochem.* 22,4592-600.
24. Wilk, H.E., Werr, H., Friederich, D., Kiltz, H.H. und Schäfer, K.P. (1985). *Eur. J. Biochem.* 146,71-81.
25. Conway, G., Wooley, J., Bibring, T. und LeStourgeon, W.M., (1988). *Mol. Cell. Biol.* 8,2884-95.
26. Adam, S.A., Nakagawa, T., Swanson, M.S., Woodruff, T.K. und Dreyfuss, G., (1986). *Mol. Cell. Biol.* 6,2932-43.
27. Grange, T., De Sa, C.M., Oddos, J. und Pictet, R. (1987). *Nucl. Acids Res.* 15,4771-86.
28. O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. und O'Farrell, P.H. (1977). *Cell* 12,1133-42.
29. Pinol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J. und Dreyfuss, G., (1988). *Genes and Development* 2,215-27.
30. Swanson, M.S. und Dreyfuss, G., (1988). *Mol. Cell. Biol.* 8,2237-41.

31. Jones, R.E., Okamura, C.S. und Martin, T.E., (1980). J. Cell. Biol. 86,235-43.
32. Christensen, M.E., LeStourgeon, W.M., Jamrich, M., Howard, G.C., Serunian, L.A., Silver, L.M. und Elgin, C.R., (1981). J. Cell. Biol. 90,18-24.
33. Lesert, G.P., Escara-Wilke, J. und Martin, T.E., (1984). J. Biol. Chem. 259,1827-33.
34. Choi, Y.D. und Dreyfuss, G., (1984). J. Cell. Biol. 99,1997-2004.
35. Cruz-Alvarez, M., Szer, W. und Pellicer, A., (1985). Nucl. Acids Res. 13,3917-29.
36. Choi, Y.D., Grabowski, P.J., Sharp, P.A. und Dreyfuss, G. (1986). Science 231,1534-39.
37. Sierakowska, H., Szer, W., Furdon, P.J. und Kole, R., (1986). Nucl. Acids Res. 14,5241-54.
38. Kumar, A., Williams, K.R. und Szer, W., (1986). J. Biol. Chem. 261,11266-73.
Chase, J.W. und Williams, K.R., (1986). Ann. Rev. Biochem. 55,103-36.
39. Riva, S., Morandi, C., Tsoulfas, P., Pandolfo, M., Biamonti, G., Merrill, B., Williams, K.R., Multhaup, G., Beyreuther, K., Werr, H., Henrich, B. und Schäfer, K.P. (1986). EMBO J. 5,2267-73.
40. Pandolfo, M., Valentini, O., Biamonti, G., Morandi, C. und Riva S. (1985). Nucl. Acids Res. 13,6577-90.
41. Swanson, M.S., Nakagawa, T.Y., LeVan, K. und Dreyfuss, G., (1987). Mol. Cell. Biol. 7,1731-9.
42. Cobianchi, F., Karpel, R.L., Williams, K.R., Notario, V. und Wilson, S. H. (1988). J. Biol. Chem. 263,1063-71.
43. LeStourgeon, W.M., Beyer, A.L., Christensen, M.E., Walker, B.W., Poupore, S.M. und Daniels, L.B., (1978). CSH Symp. Quant. Biol. 42,885-98.
44. Celis, J.E., Bravo, R., Arensdorf, H.P. und LeStourgeon, W.M., (1986). FEBS Letters 194,1 101-44.
45. De Koch, G.I., Wilk, H.E. und Schäfer, K.P., (1981). In: Mechanisms of Lymphocyte Activation. (Resch K. und Kirchner H., eds.) Seite 222-5, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
46. Melchers, K., (1987). Doktorarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
47. Planck, S.R., Listerud, M.D. und Buckley, S.D., (1988). Nucl. Acids Res. 16,11663-73.
48. Johnson, L.F., Williams, J.G., Abelson, H.T., Green, H. und Penman, S., (1975). Cell 4,69-75.
49. Johnson, L.F., Levis, R., Abelson, H.T., Green, H. und Penman, S., (1976). J. Cell Biol. 71,933-38.
50. Williams, J.G. und Penman, S., (1975). Cell 6,197-206.
51. Te Heesen, S., (1986). Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1986).
52. Hentschel, C.C. und Birnstiel, M.L., (1981). Cell 25,301-13.
53. Young, R.A. und Davies, R.W. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,1194-8.
54. Cobianchi, F., Sengupta, D.N., Zmudzka, B.Z. und Wilson, S.H. (1986). J. Biol. Chem. 261,3536-43.
55. Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F., Petersen, G.B., (1982). J. Mol. Biol. 162,729-73.
56. Williams, K.R., Stone, K.L., LoPresti, M.B., Merrill, B.M. und Planck, S.R., (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,5666-70.
57. Buvoli, M., Biamonti, P., Tsoulfas, P., Bassi, M.T., Ghetti, A., Riva, S. und Morandi C. (1988). Nucl. Acids Res. 16,3751-70.

58. Thein, S.L. und Wallace, R.B. (1986). In: Human Genetic Diseases. (Davies, K.E., ed.) Seite 33-50, IRL Press.
59. Williams, J.G. und Mason, P.J., (1985). In: Nucleic Acid Hybridisation (Hames, B.D. und Higgins, S.J., eds.) Seite 139-160, IRL Press.
60. Weiner, A.M., Deiniger, P.L. und Efstratiadis, A., (1986). Ann. Rev. Biochem. 55,631-61.
61. Deininger, P.L., Jolly, D.J., Rubin, C.M., Friedman, T. und Schmid, C.W., (1981). J. Mol. Biol. 151,17-33.
62. Karin, M. und Richards, R.I., (1982). Nature 299,797-802.
63. Srikanta, T., Landsman, D. und Bustin, M. (1987). J. Mol. Biol. 197,405-13.
64. Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, J.I., Haynes, J.R., Hochstadt, J., Kovacic, T., Pasek, M., Schamböck, A., Schmidt, J., Todokoro, K., Wäichi, M., Nagata S. und Weissmann, C., (1985). J. Mol. Biol. 185,227-60.
65. Stein, J.P., Munjaal, R.P., Lagace, L., Lai, E.C., Malley, B.W.O. und Means, A.R., (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,6485-9.
66. Soares, MB., Schon, E., Henderson, A., Karathanasis, S.K., Cate, R., Zeitlin, S., Chirgwin, J. und Efstratiadis, A., (1985). Mol. Cell. Biol. 5,2090-103.
67. McCarrey, J.R. und Thomas, K., (1988). Nature 326,501-5.
McCarrey, J.R., (1987). Gene 61,291-8.
68. Hattori, K., Angel, P., Le Beau, M. und Karin, M., (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,9148-52.
69. Breathnach, R. und Chambon, P., (1981). Ann. Rev. Biochem. 50,349-83.
70. Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R. und Cullen, B.R., (1988). Gene 66,1-10.
71. Henthorn, P., Zervos, P., Raducha, M., Harris, H. und Kadesch, T. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,6342-46.
72. Yoon, K., Thiede, M.A. und Rodan, G.A., (1988). Gene 66,11-17.
73. Cullen, B.R., (1987). Meth. Enzymol. 152,684-704.
74. Gluzman, Y., (1981). Cell 23,175-82.
75. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S. und Axel, R. (1978). Cell 14,725-31.
76. Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N., (1985). Science 230,1350-4.
77. Scharf, S.J., Horn, G.T. und Erlich, H.A., (1986). Science 233,1076-8.
78. Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Meth. Enzymol. 155,335-50.
79. Perkin Elmer Cetus (1987). Product information.
80. Li, H., Gyllenstein, U.B., Cui, X., Saiki, R.K., Erlich, H.A. und Arnheim, N., (1988). Nature 335,414-7.
81. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A., (1988). Science 239,487-91.
82. Erlich, H.A., Gelfand, D.H. und Saiki, R.K., (1988). Nature 331,461-2.
83. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Neumann, R. und Keyte, J., (1988). Nucl. Acids Res. 16,10953-71.
84. Keohavong, P., Wang, C.C., Cha, R.S. und Thilly, W.G., (1988). Gene 71,211-6.
85. Pääbo, S., Gifford, J.A. und Wilson, A.C., (1988). Nucl. Acids Res. 16,9775-87.
86. Pääbo, S. und Wilson, A.C., (1988). Nature 334,387-8.

87. Abbott, C., Gelfand, D.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A., (1988). TIG 4,325.
88. Higuchi, R., Von Beroldingen, C.H., Sensabaugh, G.F. und Erlich H.A. (1988). Nature 332,543-6.
89. Wrischnik, L.A., Higuchi, R.G., Stoneking, M., Erlich, H.A., Arnheim, N. und Wilson, A.C., (1987). Nucl. Acids Res. 15,529-42.
90. Nakamaye, K.L., Gish, G., Eckstein, F. und Vosberg, H.P., (1988). Nucl. Acids Res. 16,9947-59.
91. Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A. und Kazazian, H.H. Jr., (1987). Nature 330,384-6.
92. Koza, T., (Saitama Cancer Research Institute, Komuro, Japan), pers. Mitteilung.
93. Henrich, B., (1989) Doktorarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
94. Green, P.J., Pines, O. und Inouye, M., (1986). Ann. Rev. Biochem. 55,569-97.
95. Marcus-Sekura, C.J., (1988). Anal. Biochem. 172,289-95.
96. Toulme, J.J. und Helene, C., (1988). Gene 72,51-8.
97. Stephenson, M.L. und Zamecnik, P.C., (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,1 285-8.
98. Zamecnik, P.C. und Stephenson, M.L., (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,280-4.
99. Zamecnik, P.C., Goodchild, J., Taguchi, Y. und Sarin, P.S., (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83,4143-6.
100. Cazenave, C., Loreau, N., Toulme, J.J. und Helene, C. (1986). Biochimie 68,1063-9.
101. Haeuple, M.J., Frank, R. und Dobberstein, B. (1986). Nucl. Acids Res. 14,1427-1448.
102. Blake, K.R., Murakami, A. und Miller, P.S., (1985). Biochem. 24,6132-8.
103. Kawasaki, E.S., (1985). Nucl. Acids Res. 13,4491-5004.
104. Jessus, C., Cazenave, C., Ozon, R. und Helene, C., (1988). Nucl. Acids Res. 16,2225-33.
105. Dash, P., Lotan, I., Knapp, M., Kandel, E.R. und Goelet, P., (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,7896-900.
106. Cornelissen, A.W.C.A., Verspiieren, M.P., Toulme, J.J., Swinkels, B.W. und Borst, P., (1986). Nucl. Acids Res. 14,5605-14.
107. Jaskulski, D., De Riel, J.K., Mercer, W.E., Calabretta, B. und Baserga, R. (1988). Science 240,1544-6.
108. Gewirtz, A.M. und Calabretta, B., (1988). Science 242,1303-6.
109. Li, W.H., Wu, C.I. und Luo, C.C., (1985). Mol. Biol. Evol. 2,150-74.
110. De Wet, J.R., Fukushima, H., Dewji, N.N., Wilcox, E., O'Brien, J.S. und Helinski, D.R., (1984). DNA 3,437-47.
111. Nawa, H., Kitamura, N., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S. und Nakanishi, S., (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,90-4.
112. Busslinger, M. und Barberis, A., (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,5676-80.
113. Harvey, R.P., Degryse, E., Stefani, L., Schamber, F., Cazenave, J.P., Tolstoshev, P. und Lecocq, J.P. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83,1084-8.
114. Noda, M., Takahashie, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T., und Numa, S., (1982). Nature 299,793-7.
115. Chien, Y.H.. und Dawid, I.B., (1984). Mol. Cell. Biol. 4,507-13.

116. Fischer, R., Koller, M., Flura, M., Mathews, S., Strehler-Page, M.-A., Krebs, J., Penniston, J.T., Carafoli, E. und Strehler, E.E., (1988). *J. Biol. Chem.* 263,17055-62.
117. Kimura, M., (1983). In: *Evolution of Genes and Proteins.* (Nei, M. und Koehn, R.K., eds.) Seite 208-283, Sinauer Associates.
118. Wolfe, K.H., Sharp, P.M. und Li, W.H., (1989). *Nature* 337,283-5.
119. Kozak, M., (1989). *J. Cell Biol.* 108,229-41.
120. Novotny, J. und Auffray, C., (1984). *Nucl. Acids Res.* 12,243-55.
121. Chou, P.Y. und Fasman, G.D., (1978). *Advances in Enzymology* 47,45-148.
122. Rose, G.E. und Roy, S., (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77,4643-7.
123. Williams, K. und Merrill, B., (Yale University, New Haven, USA). pers. Mitteilung.
124. Melchers, K. und Schäfer, K.P., (1989) (Manuskript in Vorbereitung).
125. Gorman, C.M., Moffat, L.F. und Howard, B.H., (1982). *Mol. Cell. Biol.* 2,1044-51.
126. Flemington, E., Bradshaw, H.D., Traina-Dorge, V., Slagel, V. und Deininger, P.L., (1987). *Gene* 52,267-77.
127. Gomez, J., Sanchez-Martinez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomenech P. und Pages, M., (1988). *Nature* 334,262-4.
128. Mundy, J. und Chua, N.H. (1988). *EMBO J.* 7,2279-86.
129. Keller, B., Sauer, N. und Lamb, C.J., (1988). *EMBO J.* 7,3625-33.
130. Adam, S.A., Nakagawa, T., Swanson, M.S., Woodruff, T.K. und Dreyfuss, G. (1986). *Mol. Cell. Biol.* 6,2932-43.
131. Mortenson, E. und Dreyfuss, G., (1989). *Nature* 337,312.
132. Weiss, M.J., Ray, K., Henthorn, P.S., Lamb, B., Kadesh, T. und Harris, H. (1988). *J. Biol. Chem.* 263,12002-10.
133. De Wet, W., Bernard, M., Benson-Chanda, V., Chu, M.L., Dickson, L., Weil, D. und Ramirez, F., (1987). *J. Biol. Chem.* 262,16032-6.
134. Asakai, R., Davie, E.W. und Chung, D.W., (1987). *Biochem.* 26,7221-8.
135. Henthorn, P.S., Raducha, M., Kadesh, T., Weiss, M. und Harris, H., (1988). *J. Biol. Chem.* 263,12011-9.
136. BRL Laboratories (1986). *Focus* 8:2,9.
137. Messing, J., Crea, R. und Seeburg, P.H., (1981). *Nucl. Acids Res.* 9,309-21.
138. Norrander, J., Kempe, T. und Messing, J., (1983). *Gene* 26,101-6.
139. Viera, J. und Messing, J., (1982). *Gene* 19,259-68.
140. Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J., (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
141. Davies, L.G., Dibney, M.D. und Battey, J.E., (1986). In: *Basic Methods in Molecular Biology.* Elsevier Press.
142. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. und Struhl, K., (1987). In: *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley & Sons (1987).
143. Hanahan, D., (1983). *J. Mol. Biol.* 166,557-80.
144. M13-Sequencing Manual, Bethesda Research Laboratories.
145. Zeugin, J.A. und Hartley, J.L., (1985). *Focus* 7,4 (Seite 1-2).
146. Wilimzig, M., (1985). *TIG Juni*, 158.

147. Hartig-Beecken, I., (Byk-Gulden Konstanz), pers. Mitteilung. 1986.
148. Reddy, K.J., Kuwabara, T. und Sherman, L.A., (1988). Anal. Biochem. 168,324-31.
149. Pirotta, V., Ptashne, M., Chadwick, P. und Steinberg, R., (1971). In: Procedures in Nucleic Acid Research. 2,703-15.
150. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R., (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74,5463-7.
151. Tabor, S. und Richardson, C.C., (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,4767-71.
152. Hattori, M. und Sakaki, Y., (1986). Anal. Biochem. 152,232-8.
153. Boehringer Mannheim (1986). Guidelines to quick and simple plasmid sequencing.
154. Itakura, K., Rossi, J.J. und Wallace, R.B., (1984). Ann. Rev. Biochem. 53,323-56.
155. Applied Biosystems (1984). Applied Biosystems Bulletin 13.
156. Caruthers, M.H., (1982). In: Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments" (Gassen, H.G. und Lang, A., eds.) Verlag Chemie Weinheim-New York.
157. Richardson, C.C., (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54,158-65.
158. Vogt, V.M., (1973). Eur. J. Biochem. 33,192.
159. Feinberg, A.P. und Vogelstein, B., (1983) Anal. Biochem. 137,266-7.
160. Southern, E.M., (1975). J. Mol. Biol. 98,503-17.
161. Mason, P.J. und Williams, J.G., (1985). In: Nucleic Acid Hybridisation. (Hames, B.D. und Higgins, S.J., eds.) Seite 113-139. IRL Press.
162. Olszewska, E. und Jones, K., (1988). TIG 4,92-4.
163. Kidd, V.J., (1984). Focus 6,3.
164. Denhardt, D.T., (1966). Biochem. Biophys. Res. Comm. 23,641-6.
165. Favarolo, J., Treisman, R. und Kamen, R., (1980). Meth. Enzymol. 65,718-49.
166. Aviv H. und Leder P. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69,1408-12.
167. Bailey, J.M. und Davidson, D., (1976). Anal. Biochem. 70,75-85.

C U R R I C U L U M V I T A E

Persönliche Daten:

Name: Stephan te Heesen

Adresse: Byk Gulden Lomberg
Abtl. FB3 (Molekularbiologie)
Gottliebestr. 25
D-7750 Konstanz
Tel.: 07531/843277

privat:
Am Sonnenhof
D-7766 Hemmenhofen
Tel.: 07735/2818

Geburtsdatum: 26. Jan. 1959

Eltern: Gertrud Seel, geb. Mühlinghaus
6. Juli 1934
Herbert te Heesen,
geb. 11. März 1920

Familienstand: Seit 4. April 1984 verheiratet mit
Kerstin te Heesen, geb. Johannes
geb. 17. April 1963

Kinder: Jan te Heesen, geb. 10. Juni 1984
Mathias te Heesen, geb. 9. Juli 1986

Schulbildung:

Grundschule: 1965-1969

Gymnasium: 1969-1978
Mathematisch - naturwissenschaftliches
Carl-Duisberg Gymnasium in Wuppertal

Abitur: 13. Juni 1978

Wehrpflicht:

1. Juli 1978 - 30. September 1979

Universität:

seit WS 1979/80: Ruhr-Universität Bochum
D-4630 Bochum

15. April 1982: Vordiplom
- WS 83/84 und SS 84: Student an der University
of Sussex / England
1. Mai 1985 -
29. April 1986: Diplomarbeit im Labor von
Prof. Dr. Klaus P. Schäfer / Abteilung
für Biochemie / Ruhr-Universität Bochum
- "HnRNA-bindende Proteine aus HeLa-
Zellen / Monoklonale Antikörper
und Isolation von cDNA-Klonen"
- seit 1. Mai 1986: Beginn der Promotionsarbeit bei Prof.
Dr. Schäfer an der Ruhr-Universität
Bochum; Fortsetzung der Arbeit bei der
Fa. Byk Gulden Lomberg in Konstanz,
Gottliebestr. 25 / Abtl. FB3
- "Genstruktur und Expression des hnRNA-
bindenden Proteins A1"
- seit Oktober 1986: Stipendiat des "Boehringer Ingelheim
Fonds" für medizinische Grundlagen-
forschung

PUBLIKATIONS LISTE

1. Spratt, B.G., Hedge, P., Te Heesen, S., Edelman, A., Broome-Smith, J. (1986). Kanamycine-resistant vectors that are analogous of pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* 41, 337-42.
2. Te Heesen, S. (1987). HnRNA-bindende Proteine und die Kontrolle zellulärer Genexpression. *Futura* 4/87, Seiten 25-28.
3. Te Heesen, S. und Schäfer, K.P. (1989). Cloning of HnRNP core protein A1 cDNAs reveals multiple isoforms of A1 protein and mRNAs. Manuskript in Vorbereitung.
4. Te Heesen, S., Melchers K., Schäfer, K.P. (1989). HnRNP core protein A1: Characterization of a pseudogene and PCR-analysis of the A1-multigene family. Manuskript in Vorbereitung.

Vergleich möglicher TATA-regulatorischer Sequenzen

(hum = Mensch; mou = Maus; rab = Kaninchen; rat = Ratte; Genaue Angabe der Referenzen siehe GenBank-Datenbank)

Gene	Spezies	TATA-Box	Initiation	Referenz
Acetylcholin receptor α -subunit	hum	-43 TGTAGGCTGT TATATGA CACCACGAGC--CAGACCTTGG A GCTGTGTGTC -25	+1	Shibahara et al. (1985)
Alcohol dehydrogenase (Adh-1)	mou	CCGACCAAC AAAATAT GTGTGCAACT----TTGGCCCC G TTCACATAG		Ceci et al. (1987)
Adipsin	mou	GGCAGGAGTC CATAAAA CAGCCCTGAG--AGCTGTCTGG G TCAGTCGCTG -24		Min & Spiegelman (1986)
Aldolase B (major TATA/initiation site)	hum	ATGAGAAAGTC TATAAAA ATTGTGTGCT----ACCAAG A TCTGTCTTAT -29		Sakakibara et al. (1985)
α -Amylase (AMY-1/AMY-2)	hum	CTTACAGGAA TATAAAT AGTTTCTGGAAAGGACACTGAC A ACTTCAAAGC -40		Horii et al. (1987)
α -Amylase (AMY-2)	mou	TTTGTAGAAA TATAAAT AGGCGCTAGA--GACAATTCA A AGCAAAATGA -26		Bodary et al. (1985)
α -Amylase related sequence (AMY-X)	mou	TTTGTACGGA TATAAAT GGGTGTCTCA--GAGAACACT G ACAACTCAA -29		Hagenbuechle et al. (1985)
Apoferitin H	hum	CCGACGGGTC TATAAGA GACCACAGGACCCGAGGGC C AGACGTTCTT -31		Costanzo et al. (1986)
Apoferitin L	hum	CCCGGCGCAC CATAAAA GAAGCCGCCC--ACGTCCCTTC G CAGTTCGGCG -31		Santoro et al. (1986)
Apolipoprotein A1 (fetal)	hum	CTGCAGA CATAAAT AGGCCCTGCA--CTGGCTGCTT A GAGACTGCGA -26		Seilhamer et al. (1984)
Apolipoprotein A2	hum	AACAGACAGG TATATAG CCCTTCTCTC---TCCAGCCAG G GCAGGACAG -29/-33		Shelley et al. (1985) Knott et al. (1985)
Apolipoprotein CIII	hum	AACAGACAGG TATATAG CCCTTCTCTC--GGGC A GGC A CAGACACAA -28		Lackner et al. (1985)
Argininosuccinate synthetase	hum	CTGGAGATGA TATAAAA CAGGTGAGAA--CTCTCTGCTT G TCTGTCTAGT -29		Protter et al. (1984) Shelley et al. (1985)
Atrial natriuretic factor precursor	hum	GCCTGTGCTT TATAACC TGGGATGGGACCCCTGCCACT C CTGCTCTGCC ?		Jinno et al. (1985)
Bone gla protein (Osteocalcin)	hum	GCTGGGGGGC TATAAAA AGAGGGCGCACTGGGACGTGGGAGACAGGGAGAC ?		Greenberg et al. (1984)
Carbonic anhydrase II	hum	GCCAGAGGG TATAAAC AGTGTGTGAGCTGGCGGGGACGCCAGCTGAGTC ?		Celente et al. (1986)
Coagulation factor VIII	hum	GGCGGGAGCC TATAAAA GCGGGCCGGCGGACCCGCGGACACACAGTGCAG -30		Vente et al. (1985)
Coagulation factor XI	hum	GCTTCCCACT GATAAAA AGGAACAAT--ATCGGTTACT G CTTAGCTGCT ?		Gitschier et al. (1984)
Coagulation factor XII	hum	TCTCTCAAGG TATATTT CTGACATATAGATTTTATAGCACTTTCACAAAT -24		Asakai et al. (1987)
Collagenase	hum	GACCAATCTC TATTTCC AAGACTTTTG----GCCAGTC C TATTTGATCTG -32		Cool and McGillivray (1987)
α -4-Crystallin	rab	AGGACTGGCA TATAAG CAGGAGGTTT--GGATGCAGTG A GCTGTCAAGC ?		Fini et al. (1987)
C-sis proto-oncogene	mou	GCCATCTGTC TATATAT ATATCAGCTGCCAGTCTCTGTCCCATCATATCAA ?		Lock et al. (1984)
Cytochrom P-450C	hum	CCTTCTCTTT TATAAAG GCGGGAACAGCTGAAAGGGTGCCACTTCTCTCTC -30		Van de Ouweland (1986)
Cytochrome P-450(M-1)	hum	CAGCCCCGCC TATAAAG GTGCGAGTGC--CACCTTCACC C TGAAGGTGAC -29		Kawajiri et al. (1986)
Cytomegalovirus IX1 protein	rat	TAGCTAGCAT TATAAAA GTCTGCGACGACGCTCACAG G AGTCTCCCTG -29		Morishima et al. (1987)
Cytomegalovirus IX1 protein	hum	GTGCGAGCTC TATATAA GCAGAGCTCG--TAGTGAACCG T CAGATGCCCT -30		Henninghausen et al. (1986)
Cytochrom P-450C	hum	CAGCCCCGCC TATAAAG GTGCGAGTGC--CACCTTCACC C TGAAGGTGAC -29		Kawajiri et al. (1986)
Cytochrome P-450(M-1)	rat	TAGCTAGCAT TATAAAA GTCTGCGACGACGCTCACAG G AGTCTCCCTG -29		Morishima et al. (1987)
Cytomegalovirus IX1 protein	hum	GTGCGAGCTC TATATAA GCAGAGCTCG--TAGTGAACCG T CAGATGCCCT		Henninghausen et al. (1986)

Elastase II	non	-32 TAAGGCCACT CATAAA AGGAGCTTC--GGCCAGCCT A CAGACGTCCA	Stevenson et al. (1986)
Enolase	rat	-23 CGCTGGCTC TATAGC G CCGCCCGCTCCC A CCCCC G CCGCGCT	Sakimura et al. (1987)
Fibrinogen B-chain	hum	-25 CAGGAGCTTA CATAAAG GGACANTTC---AGCCTGAG A GGTGACAGTC	Rixon et al. (1985)
Gastrin	hum	-16 AGCGGAGCT TATAGTC AGCGGAGATC--AAAGATTC A CACTCATCAG	Kato et al. (1983)
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	non	-31 CCGCTCTCTC CATAAAG GCCCTGACAT--GGAGCCAGCA G AGGCAGGGCA	Balcarek et al. (1985)
β-Globin (alternative initiation sites)	hum	-27 GGCCAAAGAG TATATCT TAGAGGGAGG--TGAGGGTTTG A AGTCCTAATC	Grindlay et al. (1984)
		-49 GGCCAAAGAG TATATCT TAGAGGGAGG--CCTAAGCCAG T GCCAAGAGAG	Grindlay et al. (1984)
		-57 GGCCAAAGAG TATATCT TAGAGGGAGG--AGTGGCAGAA G AGCCAAAGAG	Grindlay et al. (1984)
zeta-Globin (embryonic)	non	-31 TGACCATGTC TATATAA AGGAGACACT--ACAAGACCA T CAGGCCAGTC	Leder et al. (1985)
Glucagon	hum	-26 AGCTGGAGAG TATATAA AAGCACTGCG--CCTTGGCTG A GAGTACAGA	White et al. (1986)
Gonadotropin (chorionic) β-subunit (gene 5)	hum	- 7 AAGCCYCAAG TAGAGCA GGGTTGAGGCT	Talmeade et al. (1984)
(gene 6)		- 7 ATGGCTCAAG TAGAGCA GAGTTGAGGCT	Talmeade et al. (1984)
Granulocyte colony-stimulating factor	hum	-33 TGGGGTTATG TATAAAG GGGCCCCCTAG--GCCCCAAAC A GCCCGAGCC	Nagata et al. (1986)
Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)	hum	7 TTCTCTGTC TATTATA GAGCTCTTTTGCCAGT GAG CCGACGTACAGAGA	Niyatake et al. (1985)
	non	-31 TCTAATCTG TATATAA GAGCTCTTTT--TGAGCCCACT A CTCAGAGAGA	Niyatake et al. (1985) Stanley et al. (1985)
Heat shock protein HSP 27	hum	-29 GGGTCAATTC CATTAAT AGAGACCTCAAGCAGCGCTGC T AAAAATACCC	Hickey et al. (1986)
Heat shock protein HSP 70	hum	-30 CGTACGACT TATAAAA CCCCAGGGG--CGCTCCGAG A ACGGCTAGCC	Drabent et al. (1986)
Histone H2A	hum	-34 CTCCAGTCAG TATAAAT ACTCTCTGCG--TCTAATGAT T TTCATTACAT	Zhong et al. (1983)
	non	-33 - -34 GCCACCGCT TATTATA AGAGCAGGAA--GAACAGTC AA TATCTCTTTT	Sittman et al. (1983)
Histone H2B	hum	-27 AGCGATTCTA TATAAAA GCGGCTCTTC--ATACCTCTGC C ACGCTCTTTT	Zhong et al. (1983)
Histone H3	hum	-33 GGTCTGACTC TATAAAA GAAGAGTAGC--CTTCTCTCCA C AGAGCTCTCT	Zhong et al. (1983)
Histone H3 (H3.1)	non	-28 CGCAAGGGTA CTAAAG GCCAAGTGC-GCTACTAGGT A TCTCACTTTT	Sittman et al. (1983)
Histone H3 (H3.2)	non	-29 ATCTCTCTTC TATAAAG GAACGAGAACTTAACCTCTGC A TTCTCTATT	Sittman et al. (1983)
Histone H4	hum	-27 CCAACTGTCG TATAAAG GCGCTGCTTC--AGGTGAGAG C CACAAAAG	Zhong et al. (1983)
Histone H4	hum	- 7 GATATCTCTG TATATTA CGGGGAAGCGGTGAGCTCCGATCGANCTAT	Sierra et al. (1983)
Lactate dehydrogenase A (LDH-A)	non	-26 GGAGCTTCCA TTAAAG CCCCCCGCG--TGCTGCTCT G CGTCTGGAG	Fukasawa & Li (1986)
MHC class II antigen (SB 3-beta chain)	hum	-18 GTTCATGGTC TCTAATA TTTC-----AACAGG A GCTCCCTTTA	Kappes et al. (1984)
MHC class II antigen (SB 4-beat chain)	hum	-13 TGGCTCTTAA TATTTC AAG-----AGG A GCTCCCTTTA	Kappes et al. (1984)
MHC class II antigen (invariant B-chain)	hum	-25 CAGCACCGAC TTAAAG GGGCAGCCGG--GGGGTCA G GGTCCAGAT	Tudo et al. (1985)
MHC HLA-A3 antigen	hum	-52 CGGTGCTGT TCTAAAG CCCCAGCCCA--GACCGCAGG A TGGCTCTGG	Strachan et al. (1984)
MHC HLA-B27 antigen	hum	-51 GGGTCCAGT TCTAAAG TCCCCAGCCA--AGAGCCGAG A TGGCGGTAC	Weiss et al. (1985)
MHC HLA-CW3 antigen	hum	- 7 CGGACCHNYC TAGAAG CCGGTGAGGCTCCGAGCTCCCGGTTCTGAAGTC	Sodoyer et al. (1984)
MHC H-2K(D) antigen	non	-55 GGAGCTGGC TATAAAG TCCAGCCAGC--GACCACTGCS A TGGCACCTG	Ivst et al. (1983)
MHC H-2K(K)	non	- 7 GGAGCTGGC TATAAAG TCCAGCCAGCCCGGAAGCTCAGAGCTCTGAATC	Arnold et al. (1984)
Immune response gene I-E beta-B	non	-34 CCCTGTCTCT TATTATC TTAGCAATGA--GAATYAATT A CAGTCTGAAG	Widera et al. (1984)
Immunoglobulin γ-VDJ(H) (allele A8.1)	non	-31 TCAGGCCAGG GATAAAA GTCACACTA--GAGAGCTGC A TCTCTCTCTC	Gerondakis et al. (1984)

Immunoglobulin μ -VDJ(H) (allele A8.2)	mon	-31 TCAGGCAGAG GATAAA GCTCAGCTA--GAGAGCTCC A TCCTCTTCTC	Geronidiakis et al. (1984)
Immunoglobulin V-lambda gene	hum	- ? CTCAATAGCA GATAAAG AGCCATCAGAACTCCAGCCCACTCTGGCGCCAG	Anderson et al. (1984)
Immunoglobulin V(H)10 (GAT-specific subgroup II)	mon	- ? TGTGATGATT AATATAG GGAATATCCACCAACATCATATGAGCCCTATCT	Schiff et al. (1986)
Immunoglobulin V(H)2B-3 (GAT-specific subgroup II)	mon	- ? AGTCTGTGAT TATTAAT ACCTGCATATCCACCAACACATATGAACACT	Schiff et al. (1986)
Immunoglobulin kappa light chain (germline; subgroup III gene V(G))	hum	- ? CCAGAGCCCA TATCAAT GCTCTGTGAGCCCTGGGAGAACTGCTCAGT	Pech and Zachau (1984)
Immunoglobulin kappa light chain (germline; subgroup III gene V(H))	hum	- ? CCAGAGCCCA TATCAAT GCTTGGGTGAGCCCTGGGAGAACTGCTCAGT	Pech and Zachau (1984)
Immunoglobulin kappa/subgroup V kappa I (germline gene: leader peptide and variable region)	hum	-54 ACTGAAGCCY TATTAAT AGGCTGGCCA--AGGACACAGC A TGGACATGAG	Wildgruber (1984) Jaenichen et al. (1984)
		-60 CCTGAAGACT TATTAAT AGGCTGGACA--CAGCATAGAC A TGGAGTCCC	Pech et al. (1984)
		- ? CCTGAAGACT TATTAAT AGGCTGATCAGCCCTGTGAGGATCAGACCCAG	Pech et al. (1984) Straubinger et al. (1984)
		-53 CCTAAGACT TCTTAAT AGGCTGGTCA--AGGACACAGC A TGGACATGAG	Pech et al. (1984)
		- ? CCTGAAGCCY TATTAAT AGGCTGGTCACCTTGTGAGGACTCAGACTCAG	Bentley & Rabbits (1980) Jaenichen et al. (1984)
		- ? CCTGAAGACT TCTTAAT AGGCTGGTCACCTTGTGAGGACTCAGACCCAC	Pech et al. (1984)
Immunoglobulin kappa/subgroup V kappa II	hum	- ? GTGAGTCTGA GATAAA GCTCAGCTCTACCCCTGGCTTGCATGATCAGGACT	Klobeck et al. (1985a)
Immunoglobulin kappa/subgroup V kappa III	hum	- ? CCAGAGCCCA TATCAAT GCTTGGGTGAGCTCTGGAGAGAGCTGCTCAGT	Klobeck et al. (1985a)
Immunoglobulin kappa/subgroup V kappa IV	hum	- ? GTTTGGATTT TATAAAC GGGCGTTTGCACTTGTAAGGACTCAACAGGC	Klobeck et al. (1985b)
Inducible 26 kDa protein in fibroblasts	hum	-32 CTCAACCCCC AATAAAT ATAGGACTGC--TCTGAGGCTC A TTCTGCCCC	Naegeman et al. (1986)
Interferon IFN-alpha 14	hum	-32 GTATGTTCTT TATTAA GACCTATGCA--CAAGGCTTTC A GAAACCTAC	Henco et al. (1985)
Interferon IFN-alpha 16	hum	-32 GTATGTTTAC TATTAA GAACATGCA--CAAGGCTTTC A GAAACCTAG	Henco et al. (1985)
Interferon IFN-alpha 4B	hum	-32 GTATGTTTAC TATTAA GACCTATGCA--CAAGGCTTTC A GAAACCTAG	Henco et al. (1985)
Interferon IFN-alpha 5	hum	-32 TATGTGACCT TTTTAA ATCTGTGCAC--CAAGGCTTTC A GAGAGAGCC	Henco et al. (1985)
Interferon IFN-alpha 6	hum	-32 GTATGTTCCC TATTAA GACCTACACA--CAAGGCTTTC A GAGAACCTAG	Henco et al. (1985)
Interferon IFN-alpha 7	hum	-32 GTATGTTTAC TATTAA GACCTATGCA--CAAGGCTTTC A GAAACCTAG	Henco et al. (1985)
Interferon IFN-beta 1	hum	-31 GACCATCTCA TATAAAT AGGCCATACC--GAGAAAGGAC A TTCTAACTGC	Nir et al. (1984)
Interferon MuIFN-alpha 1	mon	-33 GTGTTTGCCC TATTAA GACACATTTA--ATGGCTTTCA G AGAACCTAGA	Shaw et al. (1983) Pitha et al. (1985) Zwarthoff et al. (1985)
Interferon MuIFN-alpha 2	mon	-98 TGTGTTGCCC TATTAA GATAGATGCA--AAGACCCACA A TGGCTAGACT	Shaw et al. (1983) Zwarthoff et al. (1985)
Interferon MuIFN-alpha 4	mon	-43 GAGAACTTC TATTGT CCTTATTAA--CAGGCTCTCA G AGAACCTGTA	Zwarthoff et al. (1985) Pitha et al. (1985)
Interferon MuIFN-alpha 5	mon	-34 GTGTTTGCCC TATTAA GACACATCCA--TGCTCTTCA G GAACCTAGAG	Pitha et al. (1985)
Interferon MuIFN alpha 6	mon	-33 GTGTTTGCCC TATTAA GACACATTTA--ATGGCTTTCA G AGAACCTAGA	Zwarthoff et al. (1985) Pitha et al. (1985)
Interleukin-1 alpha	hum	-31 TTAAGCAAT TACAAA GGCAGAGAG--ACTCAGGCTT A AGCTGCCAGC	Furutani et al. (1986)

Interleukin-2	hum	-22 GAATTAACAG TATAAAT TGCATCTCTT-----GTTCAAG A GTTCCCTATC	Holbrook et al. (1984) Degraeve et al. (1983) Taniguchi et al. (1983)
Interleukin-2 receptor	hum	-68 TACCGCAAC TATATTG TCATCAAAA--AGAGAGTGCT A GGCAGTTTCC -28 AAACACTTCC TATATT TACATGAGAG--AAGAGATGCT A GGCAGTTTCC -31 CAGGGCTGCC TATAAG AGGAGAGATG--CAGACATCAG A AGGACGCAGG -26 CCGCTCTCTC TATAAG GGACGTGAGC---GTCCGGGCC C AGGGGCTCGG -7 GGCGCGAAC TATAAGA GGGGTGGCGCGCGGTGGCGGCTCAGGCCACC -34 - -27 TCTTCTAGC TATAAC ACTGCTGGC--CACT CCACAC GCCTCTCCA -18 ACCGGCCCTT TATAATG CGAGG-----GTCTG G ACCGCTGAGG -33 TCCAGAGG TATAAAA AGCGCTTGG--GCAGCTCAA A CCGCAGCTGT -7 CGTGTGACAG TATAAAT ATATTATGAAAAATGAGGAGGCCAGGCAATAAAA -7 TGGAGCTTGG CATAAAG TTCAATGTCTCTACACCTGCGCTGCAGTATCTC -29 GAGGAGGGG TATAAAA GCGCCTTCAC--AGAAGCCGTC A CACAGATCCA -30 ATGGGGATAA TATTAAC CAATGGCTA--CATGAGATT A AATCTGACAA -34 TGGGGCTAAT TATAAG TGGCTCCAGC--AAGCCCGGG A CGGGAGGCA -28 ATCAAGAGCTT TATAAG CCAATATCTG--GGAAGAGAAA A CCGTGAGACT -31 GCTGGGGGGC TATAAAA AGAGCGGGCA--GCAGCTGGGA G ACAGGACAGC -45 TACGGACACA TATAAGA CCGTGGCTAC--GGAGACATA G CACCTGCAGC -78 ACCCAGGGT AATAAAT CAGGGCAGAG--GGAGCCACAG A ACCTCAGTGG -31 GCATGGAGTG TATAAAA GGGGAAGGGC--GGAGCCACAG A ACCTCAGTGG -27 CCCCGGGGC TATAAG CAGCGGGGGC--GCGCGGGGC G CTCGCTCCC -36 CTGGTGAAG AATAAAT AGTGAAGTTT--CATCAGATC A CTCTGCGCTT -29 AGGCTCGGC TATAAG TACTCGGGAGACGGGGCTG G TTTGGCTGCT -34 ACGGCAGCTC TATAAAA GCTCCCTGGC--CCTAGGGCA G CAGTGGTTTC -28 CCGGGAATGG AATAAAG GGACCGGGGC--CGCGGAGGCT G CACAGAAGCG -34 GGGGCAGGC TATAAC CGCGGTTAG--CATCCCTCA G AGCGTCGGGA -33 GCAGGGAGG TATATAA GCGTTGGCGG--GGTTGTAGCA C TCTGCGGGC -25 CCGAGGGACA TATAAG GCACTGTGTTG----GCACACCC A GCCAGCAGC -24 CGGGCCCTGA TATAGC CAGGCGCGC-----GGTGGC A GCACAGTGG -24	Ishida et al. (1985) Ishida et al. (1985) Obari et al. (1986) Medwin et al. (1985) van Ooyen et al. (1985) Karin et al. (1984) Bernard et al. (1983) Weller et al. (1984) Hata et al. (1986) Hata et al. (1986) Wakasugi et al. (1986) Noda et al. (1982) Horikawa et al. (1983) Terao et al. (1983) Truong et al. (1984) Nemer et al. (1984) Warr et al. (1987) Hardman et al. (1984) Hardman et al. (1984) D'Onofrio et al. (1985) Stetler et al. (1986) Sherman et al. (1984) Levanon et al. (1985) Christophe et al. (1985) Lucero et al. (1986) Niskinins et al. (1986) Lewis et al. (1985) Pennica et al. (1984) Shirai et al. (1985) Medwin et al. (1985) Riccio et al. (1985)
LD78	hum		
Lymphotoxin (TNF-beta)	hum		
Int-1 mammary oncogene	hum		
Metallothionin IIA	hum		
Myc-oncogene	hum		
Myoglobin	hum		
Ornithine transcarbamylase	hum		
Prealbumin	hou		
Preproenkephalin	hum		
Preproenkephalin A	hum		
Prolactin	hum		
Prometridiolatin precursor	hum		
Pulmonary surfactant protein (SP5)	hum		
Renin	hum		
Retinol binding protein	hum		
Secretory leukocyte inhibitor (SLPI)	hum		
Superoxide dismutase (SOD-1)	hum		
Thyroglobulin	hum		
Transferrin	hum		
Transferrin receptor	hum		
β -Tubulin	hum		
Tumor necrosis factor (TNF-alpha)	hum		
Urokinase plasminogen activator (UPA)	hum		

